台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.68 No.1 2019

Research Articles

1 The Study of Camellia Oils from Different Process Conditions for Gastric Health Protection
Wei-Ting Lee, Ya-Lin Lee, Yu-Tang Tung, Chun-Ching Wu, and Gow-Chin Yen

16 Establishment and Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of Transgenic Potatoes
Yuan-Kai Tu, Yu-Wei Feng, Lit-Fu Chan, Shu Chen, Yen-Chun Lin, and Han-Wei Chen

28 Study on Sweet Potato Storage Disease and Etiology
Chao-Jung Wu, Hong-Ren Yang, Ching-Yi Lin, Chiao-Wen Huang, Sui-Li Hsu, Su-Yu Lai, and Hui-Fang Ni

40 Assessment of Bagging Protection at Different Timings and Mesh Sizes for Controlling Litchi Fruit Borer (*Conopomorpha sinensis* Bradley) on Litchi 'Tainung No. 1'
Tai-Chuan Wang, Jer-Way Chang, and Jen Yu Chang

47 Petal Spot of Phalaenopsis Caused by *Exserohilum rostratum*
Chiao-Wen Huang, Jin-Hsing Huang, Jhih-Nung Tsai, Li-Hsiang Chung, and Ting-Fang Hsieh

59 Evaluation of Real-Time PCR Methods for the Detection of *Banana bunchy top virus*
Cheng-Ping Kuan, Yi-Lin Chang, Ching-Shan Tseng, and Tso-Chi Yang

69 The Accurate Detection Methods for the Adventitious Presence (AP) of Hybrids of *Brassica napus* and *Brassica rapa* (campestris) L. during Winter Cropping in Taiwan
Yuan-Kai Tu, Han-Wei Chen, Yi-Chu Hung, Yen-Chun Lin, and Bo-Jein Kuo

78 A Preliminary Study on Control Efficacy of Chemical Insecticides and Colored Sticky Cards against the Sweet Potato Flea Beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch)
Yu-Ping Liang and Po-Hung Chen

ISSN 0022-4847

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.68 No.1 2019

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.68 No.1 2019

研究報告

1 不同製程條件苦茶油對胃部保健功效之研究
李瑋婷、李雅琳、童鈺棠、吳純菁、顏國欽

16 建立馬鈴薯多重聚合酶連鎖反應檢測技術
杜元凱、馮昱維、陳烈夫、陳述、林彥君、陳涵葳

28 甘藷儲藏性病害及病因之研究
吳昭蓉、楊宏仁、林靜宜、黃巧雯、許淑麗、賴素玉、倪蕙芳

40 評估套袋保護時間及網目大小於「台農1號」荔枝對荔枝細蛾防治效果
王泰權、張哲瑋、張仁育

47 由 *Exserohilum rostratum* 引起之蝴蝶蘭花瓣斑點病
黃巧雯、黃晉興、蔡志濃、張立詳、謝廷芳

59 評估使用定量PCR技術鑑定香蕉萎縮病毒
關政平、張溢麟、曾清山、楊佐琦

69 準確偵測冬季裡作偶然存在大、小油菜雜交後代之方法
杜元凱、陳涵葳、洪逸筑、林彥君、郭寶錚

78 化學殺蟲劑及有色黏紙對蘿菜小金花蟲 (*Chaetocnema confinis* Crotch) 防治效果之初探
梁鈺平、陳柏宏

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業試驗所植物病理組
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

朱燕華／食品工業發展研究所產品及製程研發中心

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

陳烈夫／農業試驗所技術服務組
吳宜晏／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十八卷　第一期　　中華民國一〇八年三月三十一日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓／電話 : (02) 2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號／電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(1):1–15 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201903_68(1).0001
研究報告

不同製程條件苦茶油對胃部保健功效之研究

李瑋婷[1] 李雅琳[2] 童鈺棠[3] 吳純菁[1] 顏國欽[4,*]

摘要

李瑋婷、李雅琳、童鈺棠、吳純菁、顏國欽。2019。不同製程條件苦茶油對胃部保健功效之研究。台灣農業研究 68(1):1–15。

由於現代人飲食型態改變、生活壓力大以及酗酒等不良習慣，胃腸道功能紊亂成為現今常見的通病，如：消化性潰瘍。苦茶油為台灣常見食用油品，於民間療法中被認為具有胃腸保健之功效。本研究室先前的研究指出，苦茶油具有預防酒精性潰瘍之功效，為進一步證實不同來源或製程之苦茶油是否有相同功效，本研究利用體外 (*in vitro*) 及體內 (*in vivo*) 試驗模式進行探討，分別利用大鼠胃黏膜細胞 (rat normal gastric surface mucous cell line; RGM-1) 及 BALB/c 小鼠。結果顯示，RGM-1 細胞以不同苦茶油預處理後皆可減緩乙醇誘導之細胞毒性，最後選擇效果最佳之 BLCO 苦茶油進行動物試驗。動物實驗結果顯示，乙醇 (5 mL kg^{-1} B.W.) 誘導 1 h 後會造成胃黏膜損傷。然而，餵食苦茶油 (1 mL kg^{-1} B.W. 及 2 mL kg^{-1} B.W.) 3 wk 或 Lansoprazole (30 mg kg^{-1} B.W.) 1 wk 後能有效改善乙醇誘導小鼠之胃損傷，提升黏膜黏液之分泌和抗氧化酵素活性，包括：過氧化氫酶 (Catalase)、麩胱甘肽-*S*-轉移酶 (Glutathione *S*-transferase; GST)、麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase; GPx) 及麩胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase; GRd)；與減緩酒精誘導胃組織發炎因子 COX-2 及 IL-1β 之蛋白表現。綜合上述，苦茶油能藉由降低氧化傷害及發炎作用，減緩乙醇所誘導的胃損傷。因此，本研究成果可作為未來開發苦茶油為胃腸相關機能性產品之參考，以提升本土農產品之經濟價值。

關鍵詞：苦茶油、消化性潰瘍、乙醇、發炎因子。

前言

消化道是一系列相連的中空管道，由口、食道、胃、小腸、大腸至肛門等器官所構成，其主要功能為將食物成分分解成小分子營養物質，經過吸收後進入血液中，再透過血液運輸至身體各部位細胞。此外，消化系統還包含了分泌賀爾蒙 (Hunt *et al*. 2015)、調節免疫 (Mowat & Agace 2014) 與平衡體內微生物 (Olivares *et al*. 2015) 等功能，與人體的健康密切相關。因此，提供消化道保護相關的食品為現代飲食重要的方向。

消化性潰瘍是常見的胃腸道疾病之一，相關疾病影響全球 8–10% 的人口 (Yao 2015)。飲酒 (乙醇) 過量會破壞胃黏膜的黏液屏障 (El-Naga 2015)、降低體內的抗氧化酵素活性、引發脂質過氧化與發炎反應，使胃組織中的發炎因子含量以及凋亡蛋白的表現量 (Choi *et al*. 2015; Olatunji *et al*. 2015) 上升，惡化胃黏膜組織的損傷 (Chauhan & Kang 2015)。H_2 受體阻斷劑及質子泵浦抑制劑為胃潰瘍常用之治療藥物，雖對於胃潰瘍具有實際的療效，但部分患者會復發，以及產生副作用，例如發生過敏反應以及心律不整等症狀 (Jalilzadeh-Amin *et al*. 2015; Ribeiro *et al*. 2016)。因此，從飲食著手，尋找減緩消化性潰瘍的天然食品為最佳解決策略。

投稿日期：2018 年 3 月 19 日；接受日期：2018 年 7 月 12 日。
[*] 通訊作者：gcyen@nchu.edu.tw
[1] 國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究生。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。
[3] 台北醫學大學代謝與肥胖科學研究所助理教授。台灣 台北市。
[4] 國立中興大學食品暨應用生物科技學系教授。台灣 台中市。

油茶為山茶科 (Theaceae) 山茶屬 (*Camellia*) 植物，其種子成熟後可榨油，俗稱苦茶油。台灣所種植的油茶樹主要可分為小果油茶 (*Camellia brevistyla*) 及大果油茶 (*Camellia oleifra*)。《本草綱目》記載：「茶油有明目亮髮、潤腸整胃、通便、清熱化濕、殺蟲、解毒之功效、促進傷口癒合」。此外，苦茶油含有豐富的單元不飽和脂肪酸，相同於「地中海飲食」(mediterranean diet) 中主要油脂橄欖油，日常食用此油脂被認為可以降低發生心血管疾病的風險 (Covas *et al*. 2009)。文獻 (Su *et al*. 2014) 指出苦茶油可促進傷口癒合，以及降低氧化壓力之功效。本研究室先前的研究指出，苦茶油中的 Sesamin 及 Compound B 均具有抗氧化功能，可降低體內的氧化壓力，同時降低大鼠於急性四氯化碳傷害中的肝損傷 (Lee *et al*. 2007)。此外，於體內或體外試驗結果顯示，苦茶油可提升腸黏膜的抗氧化酵素活性，降低發炎反應，並減緩細胞凋亡，以對抗因非類固醇抗發炎藥物 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) Ketoprofen 或乙醇所引起的腸胃黏膜損傷 (Cheng *et al*. 2014; Tu *et al*. 2017)。然而不同來源或製程之苦茶油，是否有相同功效，乃有待進一步探討。

本研究以具有抗酒精誘導腸胃潰瘍潛力的苦茶油為材料，並以活體動物試驗不同來源或製程之苦茶油，以確認改善酒精對腸胃損傷之功效，以提供未來開發腸胃保健相關產品之基礎資訊。

材料與方法

試驗樣品與藥品

Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) 培養基、F-12 Nutrient Mixture 培養基、胎牛血清 (Fetal bovine serum; FBS) 購自於 NQBB 國際生物公司 (Hong Kong, China)。Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、Penicillin-Streptomycin (PS)、anti-β-actin 抗體購自於 Cell Signaling Technology (Beverly, UK)。Anti-IL-1β antibody 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。Anti-COX-2 抗體購自於 Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)。Anti-mouse 及 Anti-rabbit 抗體購自於 Jackson Immune Research Laboratories (West Grove, PA, USA)。大豆油購自台灣糖業股份有限公司 (台灣台南市)。AHCO (油茶籽焙炒溫度 > 120℃)、BLCO (油茶籽焙炒溫度 150℃) 及 BHCO (油茶籽焙炒溫度 170℃) 等苦茶油，為產自台灣栽培之大果種油茶籽，經過高溫焙炒後壓榨生產。絕對酒精購自景明化工股份有限公司 (台灣苗栗縣)。

試驗細胞

大鼠胃黏膜細胞 (rat normal gastric surface mucous cell line; RGM-1) (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan)。RGM-1 細胞培養於含有 20% FBS、0.49% (wt/vol) $NaHCO_3$、0.357% (wt/vol) HEPES、1% (vol/vol) PS antibiotic solution (pencillin 與 streptomycin 均為 100 units mL^{-1})、F-12 Nutrient Mixture 之 Dulbecco’s Modified Eagle Medium (High glucose) 之完全培養液，並於 5% CO_2、37℃之恆溫培養箱中培養。每 2 日定期更換一次新鮮的培養液，待細胞生長 1–2 d 後可達 90% Confluence 後，即可做繼代培養，進行試驗之各項處理與分析。

試驗動物

雄性 5 週齡 BALB/c 小鼠，體重約為 19–21 g，購自樂斯科生物科技股份有限公司 (BioLASCO Experimental Animal Center, Taipei, Taiwan)。小鼠以 Lab 5001 標準粒狀飼料 (Laboratory rodent diet 5001, Newco Distributors Corporation, Rancho Cucamonga, CA, USA) 餵食，動物房溫度 22℃ ± 2℃，溼度 65% ± 5%，光照與黑暗各 12 h。本研究之動物試驗經由國立中興大學實驗動物照護及使用委員會審查通過 (動物實驗申請表暨同意書編號：104–084)。

細胞存活率測定 (MTT assay)

參考 Zhao *et al*. (2015) 之方法。將 RGM-1 細胞接種於 24 孔盤上，每孔接種濃度為 1 × 10^5 cells mL^{-1}。細胞於 37℃恆溫培養 12 h 後貼盤，再以不同苦茶油預處理 6 h 後，與 3% 乙醇於 37℃培養 24 h，移除培養液並於每

孔加入 450 µL 培養液及 50 µL 濃度 5 mg mL^{-1} 之 MTT (使系統內濃度 0.5 mg mL^{-1})，於 37℃ 反應 2 h 後將培養液移除，再加入 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 使其生成藍紫色複合物，最後以 FLUOstar galaxy reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) 於波長 570 nm 下檢測其吸光值。苦茶油濃度分別為 75、100 及 125 µg mL^{-1}，不同濃度之苦茶油樣品以 DMSO 稀釋。細胞相對存活率以下列公式計算：

存活率 (%)
= [Abs_{570} nm (sample)/Abs_{570} nm (control)] × 100%

乙醇誘導動物腸胃道傷害

參考 Halabi *et al*. (2014) 的方法並稍加修飾，於活體中評估苦茶油對腸胃黏膜潰瘍組織保護效果。使用 5 週齡 BALB/c 小鼠，以 Lab 5001 及 Reverse osmosis (RO) 水作為動物飼養之基本飲食。飼育 1 wk (適應週) 後，隨機選取每 10 隻為一組，共分成 5 組，包括控制組、傷害組、藥控組及苦茶油 (1 mL kg^{-1} B.W. 及 2 mL kg^{-1} B.W.) 組。本試驗藥控組將動物預先管餵大豆油 2 wk，再以藥物 Lansoprazole (30 mg kg^{-1} B.W.) 餵食 1 wk，其餘組別分別管餵大豆油或苦茶油 3 wk。實驗期間定期記錄動物體重、攝食量與飲水量，並於第 4 週記錄動物最後體重與禁食 24 h，並於犧牲前 1 h 以 1 次絕對酒精 (5 mL kg^{-1} B.W.) 介入傷害誘導，控制組於犧牲前 1 h 管餵 RO 水 (5 mL kg^{-1} B.W.)。實驗結束後使用 Isoflurane 麻醉動物及放血犧牲，取其胃黏膜組織分析抗氧化酵素活性，並利用 Western blot 分析發炎因子 cyclooxygenase-2 (COX-2) 與 interleukin-1β (IL-1β) 之蛋白表現；透過 Hematoxylin-Eosin (H&E) 深入觀察腸胃黏膜組織型態。

組織切片 H&E 與 Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色

腸胃組織切片染色，委託國立中興大學獸醫學院動物疾病診斷中心進行製作及判讀。將小鼠腸管及胃壁組織分割一小塊，浸漬於 10% 福馬林固定後，放入包埋盒內脫水一夜，以石蠟包埋切片，切片完成後烘乾固定，最後以 H&E 與 PAS 染色法進行染色。

抗氧化酵素活性測定

抗氧化酵素 Catalase 活性測定：參考 Sofidiya 之方法 (Sofidiya *et al*. 2015)。取胃黏膜均質液，加入 25 mM H_2O_2/50 mM potassium phosphate buffer (pH = 7.0)，以分光光度計 (U-3000 spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan) 記錄在 240 nm 下 2 min 內吸光值下降之情形。其酵素活性以 E240 = 43.6 M^{-1} cm^{-1} 計算，結果以 nmol H_2O_2 min^{-1} mg $protein^{-1}$ 表示之。

抗氧化酵素 GPx 活性測定：參考 Hsu *et al*. (2010) 的方法，取胃黏膜均質液，加入含有 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1 mM NaN_3、0.2 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)、1 U mL^{-1} glutathione (GSH) reductase 及 1 mM GSH 之 100 mM potassium phosphate buffer (pH = 7.0) 混合均勻後，於室溫下反應 5 min，再加入 100 µL 2.5 mM H_2O_2 起始反應，以 FLUOstar galaxy reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) 紀錄於 340 nm 下其 3 min 內的吸光值變化。其酵素活性以 E340 = 6220 M^{-1} cm^{-1} 計算，結果以 nmol NADPH min^{-1} mg $protein^{-1}$ 表示之。

抗氧化酵素 GRd 活性測定：參考 Hsu *et al*. (2010) 的方法，取胃黏膜均質液，加入含有 1 mM $MgCl_26H_2O$、50 mM glutathione disulfide (GSSG) 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM potassium phosphate buffer (pH = 7.0) 混合均勻後，於室溫下反應 3 min，以 FLUOstar galaxy reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) 記錄於 340 nm 下其 3 min 內之吸光值變化。其酵素活性以 E340 = 6,220 M^{-1} cm^{-1} 計算，結果以 nmol NADPH min^{-1} mg $protein^{-1}$ 表示之。

抗氧化酵素 GST 活性測定：參考 Lee *et al*. (2007) 的方法，取胃黏膜均質液，加入含有 100

mM GSH 之 100 mM potassium phosphate buffer (pH = 6.5) 及 20 μL 50 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)，混合均勻後以 FLUOstar galaxy reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) 記錄於 340 nm 下 3 min 內的吸光值變化。酵素活性以 E340 = 9.6 mM^{-1} cm^{-1} 計算，結果以 CDNB-GSH conjugated formed min^{-1} mg $protein^{-1}$ 表示之。

COX-2 及 IL-1β 蛋白質表現之測定

小鼠胃組織之 COX-2 及 IL-1β 蛋白質表現，以西方墨點法進行分析。

統計分析

所有試驗結果以平均值 (Mean) ± 標準偏差 (Standard deviation; SD) 表示。試驗數據以統計分析系統 (Statistical product and service solutions; SPSS) 進行分析，以 One way-analysis of variance (One way ANOVA) 分析變異數，並以 Duncan's multiple-range comparison 比較變數之顯著性差異 ($P < 0.05$)。

結果

不同製程條件之苦茶油對 RGM-1 細胞之保護功效

大鼠胃黏膜 RGM-1 細胞為一個正常的胃黏膜細胞，可用於模擬乙醇介入時對於胃部黏膜細胞的損傷。圖 1A–1C 顯示，細胞以不同的苦茶油 (75、100 及 125 μg mL^{-1})：AHCO、BLCO 與 BHCO 預處理 6 h 後，再介入 3% 乙醇傷害 24 h 之存活影響。與乙醇傷害組相較下，苦茶油組皆能顯著提高乙醇所誘導 RGM-1 的細胞存活率 ($P < 0.05$)。於 75 μg mL^{-1} 苦茶油濃度下，BLCO 與 BHCO 之間、BHCO 與 AHCO 之間無顯著性差異，但是均顯著低於控制組。當濃度提高至 100 μg mL^{-1} 苦茶油，BLCO 與 BHCO 之間無顯著差異，但是效果優於 AHCO，但是仍低於控制組。當以 125 μg mL^{-1} 苦茶油濃度試驗時，細胞存活率為 BLCO > BHCO > AHCO，彼此均有顯著性差異 ($P < 0.05$)，同時 BLCO 的細胞存活率，已經與控制組相當，二者之間無顯著差異。根據此實驗的結果，最後選擇 BLCO 作為後續動物實驗之油品。

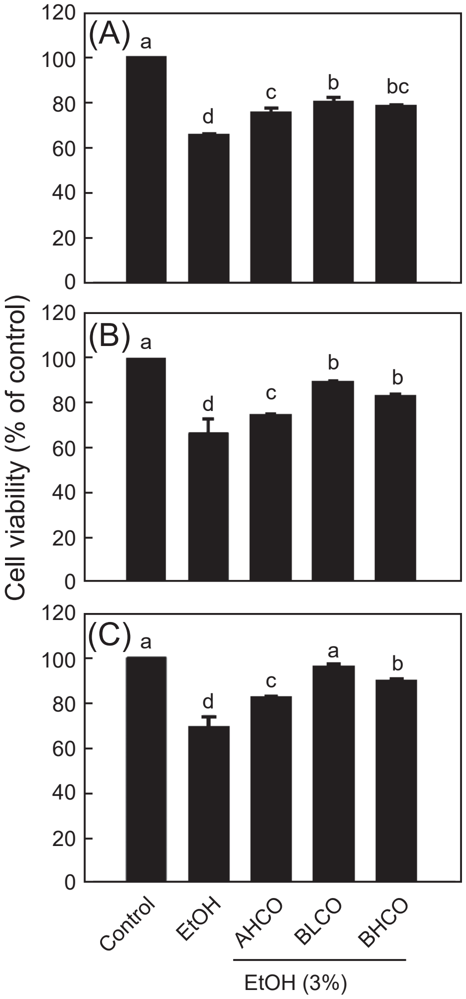

圖 1. 低、中、高濃度 (75 、100 及 125 μg mL^{-1}) 之不同製程條件苦茶油改善乙醇誘導 RGM-1 細胞存活率之表現。

Fig. 1. Ethanol impaired-RGM-1 cell viability was improved by different concentrations (75, 100 and 125 μg mL^{-1}) of AHCO, BLCO, and BHCO camellia oils, respectively. Cells were pretreated with 75 μg mL^{-1} (A), 100 μg mL^{-1} (B), or 125 μg mL^{-1} (C) of AHCO, BLCO, and BHCO camellia oils for 6 h, respectively. Then, cells incubated with 3% ethanol for 24 h and subsequently cell viability was measured. Results are the means ± SD for $n = 3$. The values denoted by the different letters show significantly at $P < 0.05$ as determined using Duncan's multiple range test.

BLCO 苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃潰瘍之保護作用

餵食苦茶油3 wk與1 wk Lansoprazole (30 mg kg^{-1}) 對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃組織損傷宏觀分析結果，如圖 2A 所示。控制組之胃黏膜組織並無任何損傷與潰瘍現象。而在以乙醇誘導損傷之傷害組，可觀察出胃黏膜組織有明顯的受損及黏膜組織結構鬆散，且胃黏膜層有廣泛的病變以及出血壞死的現象。餵食 BLCO 苦茶油 (1 mL kg^{-1} 及 2 mL kg^{-1}) 3 wk 後，再以乙醇誘導傷害，結果與傷害組相比，苦茶油有減緩胃黏膜的損傷。藥控組以 Lansoprazole 餵食 1 wk，其胃黏膜組織之損傷程度與傷害組相比，呈較完整的狀態。

利用 Image J 進行量化得圖 2B，顯示乙醇成功誘導胃黏膜組織損傷，比較抑制損傷百分比：餵食 BLCO 苦茶油 (1 mL kg^{-1} 及 2 mL kg^{-1}，分別以 COL、COH 標示) 與 Lansoprazole 之組別，結果為抑制率 Lansoprazole > COH > COL，且彼此之間均有顯著差異 ($P < 0.05$)。其中，Lansoprazole 組之抑制率微幅低於控制組，而苦茶油則具劑量效應。綜合上述結果，顯示苦茶油具有保護胃黏膜完整性之效果。

H&E 染色組織病理判讀苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃腸組織之影響

圖 3 顯示餵食苦茶油與 Lansoprazole 對乙醇誘導小鼠胃腸黏膜組織切片染色圖判讀，分別為倍率 40× 與 400× 之結果。結果顯示與控制組比較，餵食乙醇傷害組的胃黏膜層細胞受到侵蝕而被破壞產生潰瘍。苦茶油 (1 mL kg^{-1} 及 2 mL kg^{-1}) 餵食 21 d 後，再以乙醇誘導傷害，其結果與傷害組相比，胃黏膜組織損傷程度較為緩和。試驗藥控組於誘導傷害前連續餵食 Lansoprazole (30 mg kg^{-1}) 1 wk，其胃黏膜組織最為完整。關於腸黏膜組織之切片染色結果，顯示各組別均無受到傷害，顯示此乙醇急性誘導模式對於腸組織不會造成傷害，此外，餵食苦茶油與 Lansoprazole 也不會對腸組織造成影響。

表 1 為腸胃黏膜組織的損傷與出血積分量化之統計分析。在胃黏膜損傷積分判讀中，乙醇誘導組與控制組相比有顯著差異 ($P < 0.05$)，給予不同劑量苦茶油 (1 mL kg^{-1} 及 2 mL kg^{-1}) 與 Lansoprazole 藥劑，皆顯著減緩乙醇誘導的胃黏膜損傷，其中 Lansoprazole 具有最佳減緩效果，而苦茶油組呈現劑量效應。另外，在小

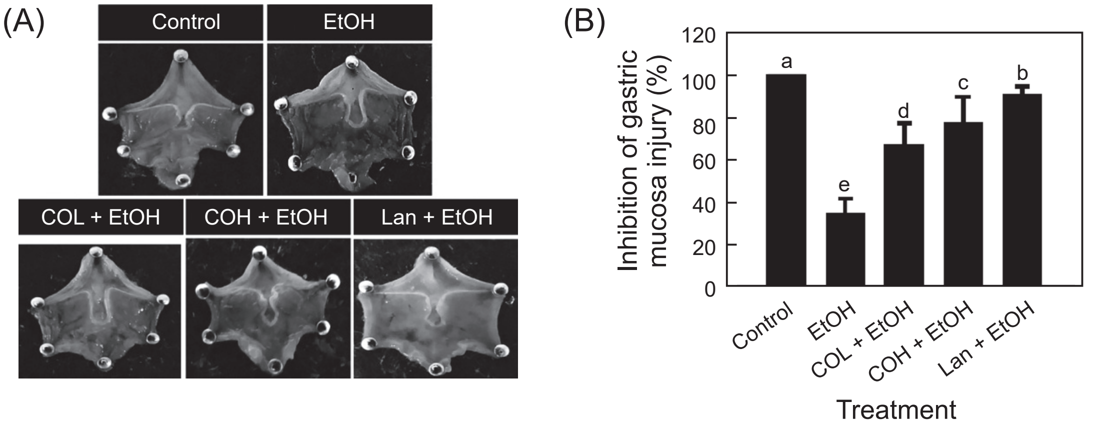

圖 2. BLCO 苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃組織型態之影響。

Fig. 2. Macroscopic photo images of gastric lesions (A) and inhibition of gastric mucosal injury in ethanol-induced BALB/c mice (B) after administration of camellia oil. The animals received an oral administration of BLCO camellia oil (1 mL kg^{-1} and 2 mL kg^{-1}) for 3 wk or lansoprazole (30 mg kg^{-1}) for 1 wk, and then absolute alcohol (5 mL kg^{-1}) was orally administrated to all animals for 1 h before sacrifice. EtOH: 5 mL kg^{-1} absolute ethanol; COL: 1 mL kg^{-1} camellia oil; COH: 2 mL kg^{-1} camellia oil; and Lan: 30 mg kg^{-1} lansoprazole. The data represent the means ± SD for n = 10. The values denoted by the different letters show significantly at $P < 0.05$ as determined using Duncan's multiple range test.

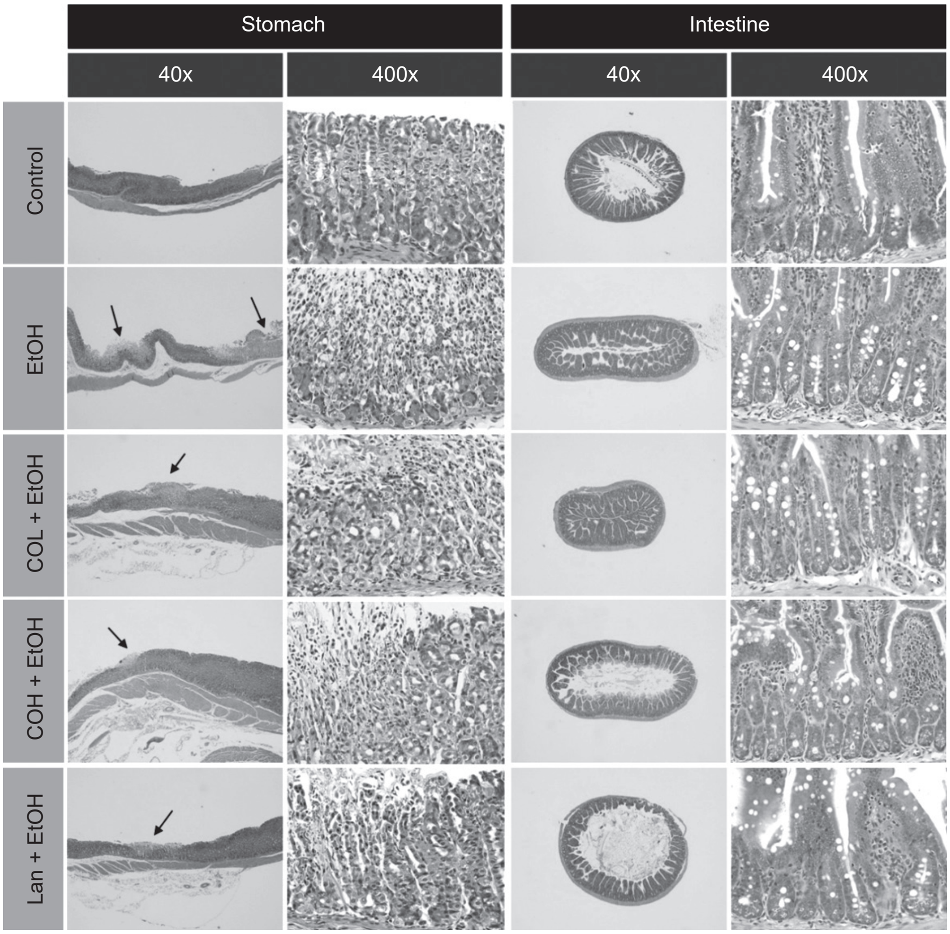

圖 3. H&E 染色組織病理判讀 BLCO 苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃腸組織之影響。

Fig. 3. Effect of BLCO camellia oil on ethanol-induced gastric mucosal damage determined by H&E stain in BALB/c mice. The experimental procedure is the same as shown in Fig. 2. Black arrows showed the gastric damage with focal, moderate severe degeneration/necrosis with hemorrhage.

表 1. BLCO 苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃損傷與出血積分之影響。

Table 1. Effect of BLCO camellia oil on the injury and hemorrhage scores of ethanol-induced gastric damage in BALB/c mice.

	Stomach	
Experimental group[z]	Injury score[y]	Hemorrhage score[y]
Control	0.0 ± 0.0 d[x]	0.0 ± 0.0 c
EtOH	3.4 ± 0.7 a	2.3 ± 0.5 a
COL + EtOH	2.3 ± 0.5 b	1.6 ± 0.5 b
COH + EtOH	1.7 ± 1.0 c	1.4 ± 0.7 b
Lan + EtOH	0.1 ± 0.3 d	0.1 ± 0.3 c

[z] The experimental procedure is the same as shown in Fig. 2.

[y] Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1–25%); 3 = moderate (26–50%); 4 = moderate/severe (51–75%); and 5 = severe/high (76–100%).

[x] The values denoted by the different letters (a, b, c, and d) showed significantly different from each other at $P < 0.05$ by Duncan's test.

腸損傷積分中，則未判讀出任何損傷的現象，所以沒有放入表中呈現。在胃出血積分中，於統計學上呈現與胃損傷積分相同的趨勢，給予不同劑量苦茶油 (1 mL kg^{-1} 及 2 mL kg^{-1}) 與 Lansoprazole 藥劑，皆顯著減緩乙醇誘導的胃出血現象。由此組織切片觀察，乙醇造成胃黏膜嚴重損傷與出血，餵食苦茶油 (1 mL kg^{-1} 及 2 mL kg^{-1}) 與 Lansoprazole 藥劑皆可有效預防乙醇造成胃黏膜之損傷、維持其組織之完整性。

PAS 染色組織病理判讀苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃腸組織之影響

圖 4A 呈現 PAS 染色結果，顯示經過乙醇處理的傷害組，可觀察出其 PAS 染色強度明顯降低，表示乙醇降低了胃壁黏液的產生。在苦茶油與 Lansoprazole 試驗組，顯示較高之 PAS 染色強度，代表胃黏膜的醣蛋白含量增加。

進一步利用 Image J 進行黏液量化分析。圖 4B 顯示乙醇的誘導使得胃黏膜黏液量降低極大 (積分值由 6 降低至 1)，而餵食高劑量苦茶油 (2 mL kg^{-1}) 與 Lansoprazole 藥劑組，則有效提高黏液積分值 (P < 0.05)，然而，低劑量苦茶油，則無此效果，並 Lansoprazole 組具有最高黏液積分 (5 分)。

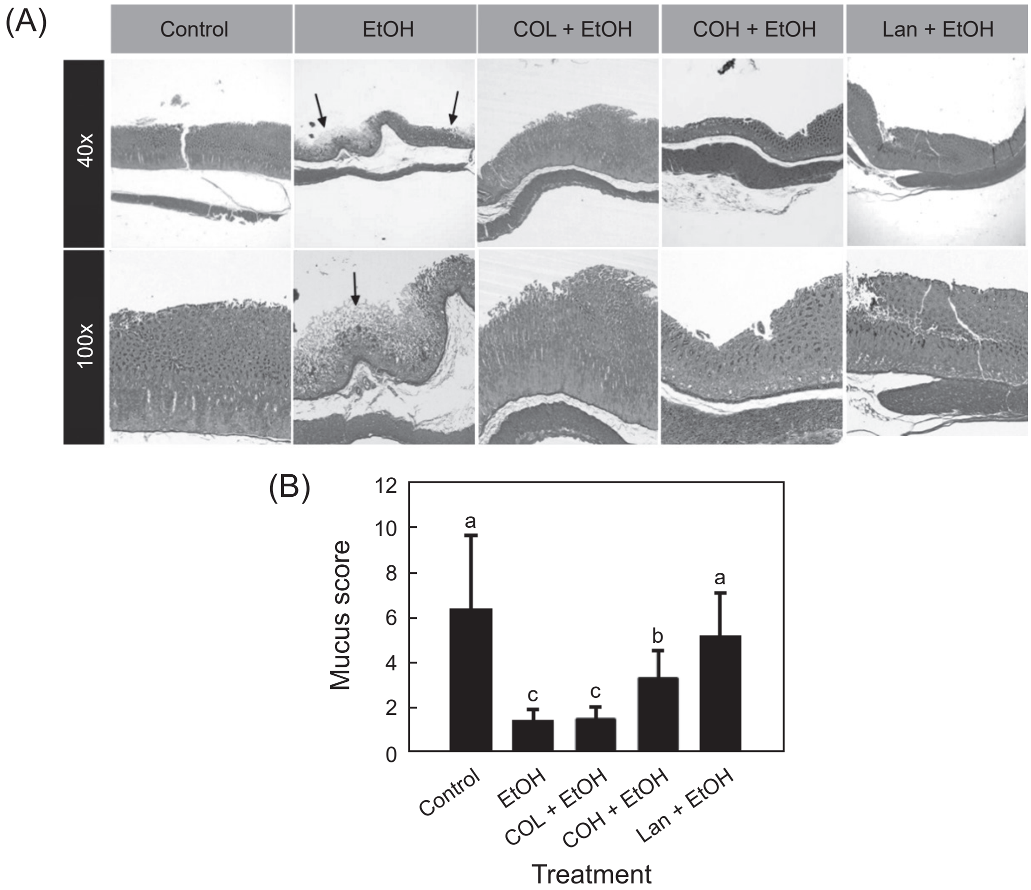

圖 4.　PAS 染色判讀 BLCO 及苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃組織之影響。

Fig. 4.　Effect of BLCO camellia oil on ethanol-induced gastric mucosal damage determined by PAS stain (A) and mucus score in BALB/c mice (B). The experimental procedure is the same as shown in Fig. 2. Black arrows show the gastric damage with a reduced intensity of PAS staining.

苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃黏膜組織氧化傷害之保護效果

圖 5A、5B 分別表示 Catalase 與 GST 抗氧化酵素活性。結果顯示乙醇傷害組之 Catalase 與 GST 抗氧化酵素活性，顯著低於控制組 (P < 0.05)，而餵食苦茶油組別 (1 mL kg^{-1} 及 2 mL kg^{-1}) 有提升酵素活性之趨勢。針對 Catalase 酵素活性，高劑量苦茶油與 Lansoprazole 組顯著減小乙醇抑制此酵素的活性 (P < 0.05)。對於 GST 酵素，則低劑量苦茶油即可有效改善此酵素活性，而高劑量苦茶油與 Lansoprazole 組效果相當，並且可以達到控制組之 GST 活性強度 (P < 0.05)。

圖 5C、5D 分別表示 GPx 與 GRd 抗氧化酵素活性，乙醇傷害組之酵素活性顯著低於控制組 (P < 0.05)。餵食苦茶油之組別有提升 GPx 與 GRd 活性之趨勢，特別是針對 GRd 酵素，高劑量苦茶油組可以提升此酵素活性接近控制組 (P < 0.05)，無統計學上之顯著差異。然而，餵食 1 wk Lansoprazole 藥劑，其 GPx 與 GRd 酵素活性均有顯著提升 (P < 0.05)，特別是針對 GRd 酵素，其效果優於高劑量苦茶油。

苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃黏膜組織發炎因子表現之影響

圖 6 結果分別呈現苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃黏膜組織發炎因子 COX-2 及 IL-1β 蛋白表現之影響。試驗結果顯示，經過乙醇的誘導傷害，COX-2 及 IL-1β 蛋白表現皆顯著增加 (P < 0.05)。餵食苦茶油與傷害組比較，COX-2 蛋白表現有顯著降低 (P < 0.05)。然而，低劑量苦茶油 (1 mL kg^{-1}) 對於乙醇誘導所提升之 IL-1β 表現，則無顯著的抑制效果，僅於高劑量苦茶油組有效 (P < 0.05)。以上結果顯示餵食高劑量苦茶油 (2 mL kg^{-1}) 及 Lansoprazole 之組別，皆可以減緩乙醇誘導胃黏膜組織 COX-2 及 IL-1β 之蛋白表現 (P < 0.05)。

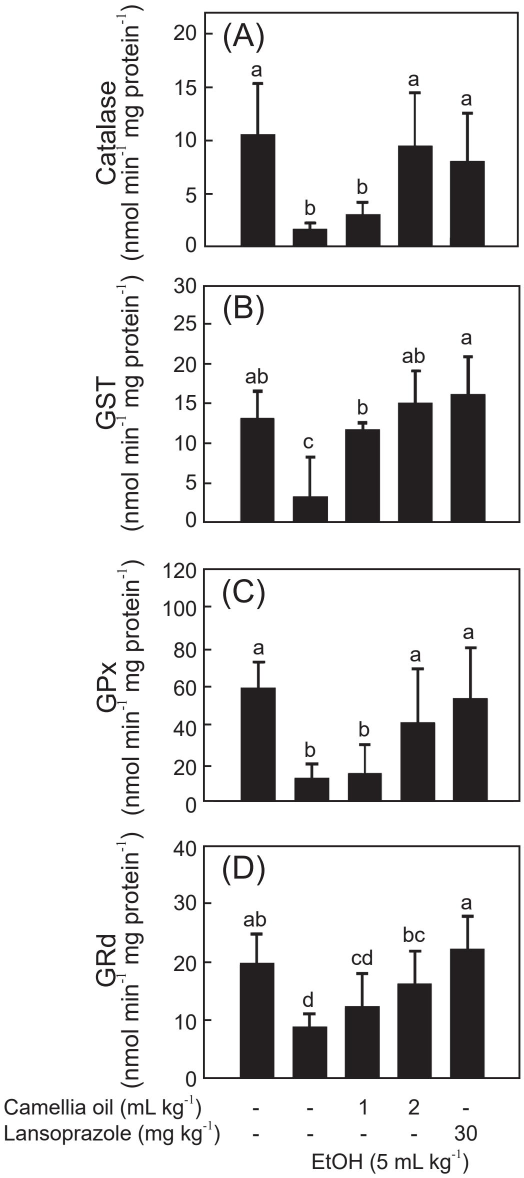

圖 5. BLCO 苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃組織 Catalase、GST、GPx 與 GRd 酵素活性之影響。

Fig. 5. Effect of BLCO camellia oil on ethanol-induced antioxidase enzymes in the levels of Catalase (A); GST (B); GPx (C); and GRd (D) in the gastric mucosa of BALB/c mice. The experimental procedure is the same as shown in Fig. 2. The data represent the means ± SD for n = 8 or 10. The values denoted by the different letters show significantly at P < 0.05 as determined using Duncan's multiple range test.

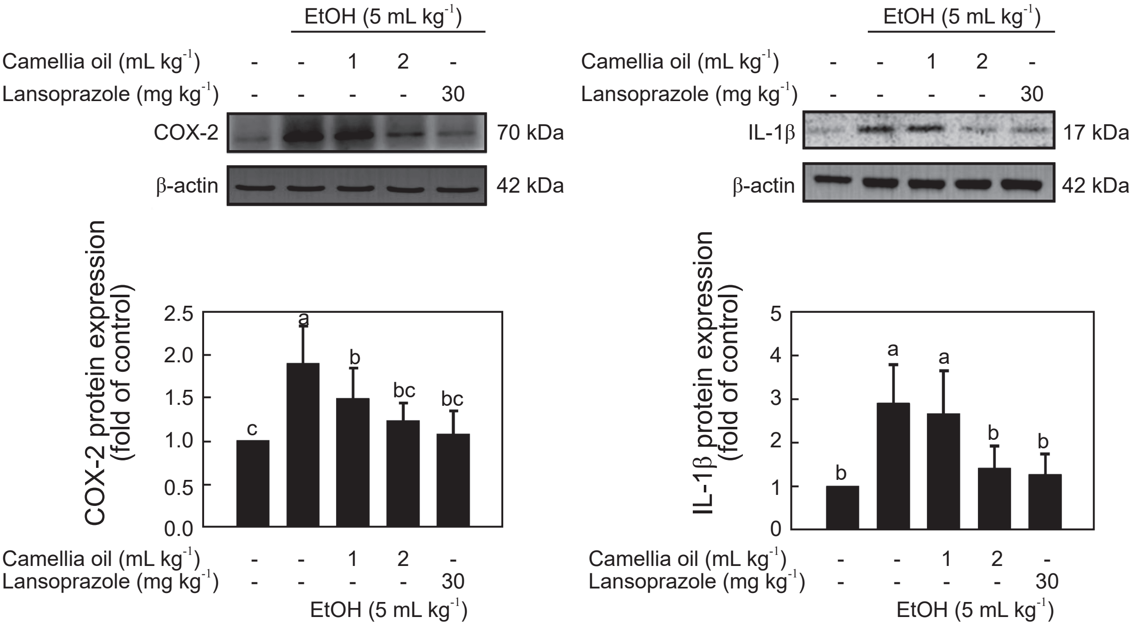

圖 6. BLCO 苦茶油對乙醇誘導 BALB/c 小鼠胃組織 COX-2 與 IL-1β 蛋白表現之影響。

Fig. 6. Effect of BLCO camellia oil on ethanol-induced COX-2 and IL-1β protein expression in the gastric mucosa of BALB/c mice. The experimental procedure is the same as shown in Fig. 2. The data represent the means ± SD for n = 6. The values denoted by the different letters show significantly at $P < 0.05$ as determined using Duncan's multiple range test.

討論

胃腸疾病中常見的消化性潰瘍發生在胃部或十二指腸，其中，胃潰瘍為最普遍的胃腸道疾病之一，且已證實為全球性的健康問題 (Omar *et al*. 2017)。促使消化性潰瘍發展的因素繁多，如：幽門螺旋桿菌感染、抽菸、過度使用非類固醇抗發炎藥物或酒精，以及心理壓力等等 (Shi & Wang 2017)。世界衛生組織統計 2006–2010 年的酒精消耗量變化，呈現全球的消耗量有上升的趨勢，其中尤以亞洲地區為主 (World Health Organization 2014)。酒精飲用過量會破壞胃黏膜的防禦屏障，增加上消化道出血的風險，發生上皮細胞脫落與黏膜水腫等症狀，進而導致胃部潰瘍 (Luiz-Ferreira *et al*. 2012; Choi *et al*. 2015)。常用於治療腸胃潰瘍的保護劑，屬於非特異性藥物，如制酸劑、H_2 受體阻斷劑 (Ranitidine 和 Famotidine) 以及質子泵浦抑制劑 (Omeprazole 和 Lansoprazole) 等 (Golbabapour *et al*. 2013)。然而，長期使用這些藥物，不僅無法根除產生潰瘍的原發性致病因子，還會使得鈣、鐵、鎂及維生素 B12 的吸收受到影響 (Abdelwahab *et al*. 2013)。

本研究室先前試驗證實，苦茶油可以降低大鼠於急性四氯化碳傷害中的肝臟損傷 (Lee *et al*. 2007)，其中所含的 Compound B 及 Ses-amin 具有良好的抗氧化能力 (Lee & Yen 2006)。此外，亦發現苦茶油可以保護因非類固醇抗發炎藥物 Ketoprofen 所引起的腸胃黏膜損傷 (Cheng *et al*. 2014)，以及改善乙醇誘導之胃損傷 (Tu *et al*. 2017)。近年來，食用油的食安事件層出不窮，國人對食用油的安全性與機能性更加重視，因此為推崇本土苦茶油，提升苦茶油價值，本研究探討不同來源或製程之苦茶油，對於乙醇 (酒精) 誘導胃部損傷之保護作用，並驗證先前之研究結果。

先前研究證實乙醇會造成大鼠胃黏膜 RGM-1 細胞毒性及細胞型態皺縮，而細胞以

苦茶油預處理，可提高乙醇所誘導傷害之細胞存活率 (Tu *et al*. 2017)。故首先篩選不同製程苦茶油對於對乙醇所誘導 RGM-1 細胞損傷之保護作用。試驗利用不同濃度之苦茶油進行篩選 (圖 1)。在乙醇的誘導傷害下，不同苦茶油對 RGM-1 的存活率具有提升之功效。隨著濃度的提升，不同苦茶油間對 RGM-1 的保護功效愈加顯著。最後以 BLCO 作為動物試驗之苦茶油樣品。

為評估各種胃潰瘍之新療法，或是天然物之保護功效，乙醇作為動物或臨床研究之胃黏膜損傷藥物之研究相當普遍 (Abdelwahab *et al*. 2013)。先前研究顯示，苦茶油可藉提升抗氧化酵素活性與抑制發炎因子表現等，改善乙醇誘導之胃損傷 (Tu *et al*. 2017)。故本研究以動物試驗探討 BLCO 苦茶油對乙醇誘導胃黏膜傷害之保護能力。乙醇的誘導會使得胃黏膜呈現嚴重的損傷，有急性出血性胃糜爛的現象 (Chen *et al*. 2015a)。由圖 2 與圖 3 顯示小鼠胃的宏觀與微觀變化。單獨使用乙醇誘導之傷害組，同樣有明顯的胃出血與黏膜嚴重受損之情形。由組織學觀察結果顯示，乙醇確實造成小鼠嚴重胃黏膜損傷，且其胃黏膜細胞受到嚴重侵蝕，細胞有發炎浸潤之情形，損傷積分與出血積分有顯著相關性。攝食苦茶油低、高劑量 3 wk 後，以乙醇誘導急性潰瘍，再由組織切片圖觀察，顯示苦茶油 (1 mL kg^{-1} 及 2 mL kg^{-1}) 可改善胃黏膜損傷與出血的現象，且與 Lansoprazole (30 mg kg^{-1}) 對照組的保護效果相當，相同結果過去的研究，Lansoprazole 可減少潰瘍的面積以及出血的症狀 (Chen *et al*. 2015a)。於腸黏膜組織切片結果顯示，乙醇對腸黏膜並無造成明顯的損傷現象，損傷積分為 0，推測此為短時間誘導傷害，尚未使腸組織發生傷害，並且現今研究對於乙醇誘導之潰瘍探討，主要著重於胃部潰瘍，鮮少有針對腸道潰瘍進行討論的文獻報告。

消化性潰瘍起因於防禦性因子與侵入性因子不平衡所致，其中防禦性因子包括黏液的分泌 (Baiubon *et al*. 2016)。酒精的誘導會使得黏液分泌與黏膜循環等胃部防禦因子受到損害 (Kushima *et al*. 2005; Boligon *et al*. 2014)。而治療胃潰瘍之質子泵抑制劑如：Lansoprazole 或 Omeprazole，可以提升黏液的含量，提供胃黏膜適當的保護 (Al-Qarawi *et al*. 2005; Al Batran *et al*. 2013)。胃黏液為保護胃黏膜免於遭受損傷的關鍵防禦因子，而胃壁黏液的含量可作為評估胃黏液分泌的指標 (Rujjanawate *et al*. 2005; Al-Wajeeh *et al*. 2017)。圖 4 結果顯示經過乙醇處理的傷害組 PAS 染色強度明顯降低，表示黏液的生成受到損害，在高劑量苦茶油 (2 mL kg^{-1}) 與 Lansoprazole (30 mg kg^{-1}) 組，胃壁黏液的含量較高。由上述結果推測，苦茶油可以增加胃黏液分泌量、提升胃部的防禦能力，因此達到對胃部的預防保護效果。

過量乙醇的攝取會嚴重損害胃腺上皮細胞，導致嗜中性白血球進入受到破壞的胃黏膜組織，進而滲入嗜中性白血球釋出之活性氧與自由基、攻擊胃黏膜，發生更嚴重的破壞 (Al-Wajeeh *et al*. 2017)。研究顯示活性氧與自由基，如：超氧陰離子 (O_2^-) 與羥基自由基 (•OH) 等，會使組織氧化壓力提高，是造成組織向潰瘍發展的有害物質 (Boligon *et al*. 2014)。本研究探討餵食苦茶油對胃黏膜抗氧化酵素：Catalase、GST、GPx 與 GRd 活性之影響。如圖 5 分析顯示，傷害組之抗氧化酵素表現量與控制組相比顯著較低 ($P < 0.05$)，餵食高劑量苦茶油 (2 mL kg^{-1}) 及正控藥物 Lansoprazole (30 mg kg^{-1}) 可提升抗氧化酵素的活性。低劑量苦茶油 (1 mL kg^{-1}) 組則可顯著的提升 GST 酵素活性 ($P < 0.05$)。過去研究發現，乙醇的誘導會降低抗氧化酵素的活性，提高體內氧化壓力 (Shin *et al*. 2013; Albaayit *et al*. 2016)。而治療潰瘍的質子泵浦抑制劑藥物如：Lansoprazole 或 Omeprazole，可藉由抗氧化能力保護胃黏膜 (Shin *et al*. 2013; Chen *et al*. 2016)，與本研究結果一致。另外，苦茶油中的兒茶素、Kampferol 與 Sesamin 等機能性成分，經研究證實具有抗氧化之功效 (Sang *et al*. 2011; Liu *et al*. 2013; Ye *et al*. 2013)。因此，推測苦茶油因為具有抗氧化能力，因而提升了乙醇誘導所降低的抗氧化酵素活性、降低胃黏膜組織之氧化壓力。

發炎反應為判讀胃腸黏膜組織健康與否

之重要依據，劇烈的發炎反應不僅會引起疼痛，更可能增加罹患胃癌的風險 (Motawi *et al*. 2008; Bie *et al*. 2016)。發炎因子的主要來源為嗜中性白血球 (Fard *et al*. 2011)，在乙醇的誘導下，會促使白血球浸潤、釋出發炎因子，進而使胃黏膜組織發生急性病變 (Boligon *et al*. 2014; Shi & Wang 2017)。本研究結果顯示，傷害組之發炎因子 COX-2 與 IL-1β 的含量顯著高於控制組 ($P < 0.05$) (圖 6)。在預先餵食苦茶油與 Lansoprazole (30 mg kg^{-1}) 組，可以降低乙醇誘導提升的 COX-2 與 IL-1β 蛋白質表現量。過去研究顯示，苦茶油中所含之兒茶素、山柰酚、皂苷與角鯊烯等 (Abd El-Aziz *et al*. 2012; Liu *et al*. 2014; Yang *et al*. 2014; Cárdeno *et al*. 2015)，具有抗發炎之功效。研究指出乙醇可活化 NF-κB 參與之發炎路徑、調節 COX-2 基因表現，以及促進發炎因子如 IL-1β 之釋出 (Chang *et al*. 2015; Chen *et al*. 2015b)。由 NF-κB 分子為細胞發炎路徑常見的訊號，它參與調控各種免疫反應與急性發炎反應的基因表現 (Wang *et al*. 2014)。據此推測，本實驗之苦茶油可能藉由降低 NF-κB 之相關發炎路徑，減緩了胃黏膜組織的炎症反應，因而對小鼠之胃黏膜產生預防保護效果。

BLCO 苦茶油經分析結果顯示含有油酸、多酚類化合物與維生素 E (數據未呈現)。過去研究顯示油酸可以改善發炎反應，並且對於傷口具有促進癒合的作用 (Rodrigues *et al*. 2012)。除此之外，苦茶油中的多酚類包括：Catechin (Hamaishi *et al*. 2006; Cheng *et al*. 2013)、Kaempferol (Goel *et al*. 1996; Boligon *et al*. 2014)、Saponin (Morikawa *et al*. 2006) 與 Vitamin E (Kamisah *et al*. 2014)，經研究證實具有抗 NSAIDs、乙醇或醋酸等誘導之腸胃潰瘍。本研究證實，乙醇誘導所降低之胃壁黏液減少、氧化壓力與發炎反應上升，可以預先餵食苦茶油而降低胃部潰瘍之症狀，其機制包括提高胃黏膜分泌量、降低氧化壓力與炎症反應，進而保護小鼠胃黏膜組織、保持胃黏膜之完整性。此外，細胞試驗結果顯示，不同來源、製程之苦茶油，保護胃部細胞之功效具有差異，本研究以 BLCO 苦茶油功效較佳，將作為未來開發國產苦茶油保護胃部機能性產品之重要依據。

誌謝

本研究係執行行政院農委會農糧署 105 農科–15.3.1–糧–Z1(4) 計畫之成果。本試驗期間承國立中興大學獸醫病理生物學研究所廖俊旺教授協助病理切片試驗相關工作，在此致謝。

引用文獻

Abd El-Aziz, T. A., R. H. Mohamed, H. F. Pasha, and H. R. Abdel-Aziz. 2012. Catechin protects against oxidative stress and inflammatory-mediated cardiotoxicity in adriamycin-treated rats. Clin. Exp. Med. 12:233–240.

Abdelwahab, S. I., M. M. Taha, M. A. Abdulla, N. Nordin, A. H. Hadi, S. Mohan, J. J. Jayapalan, and O. H. Hashim. 2013. Gastroprotective mechanism of *Bauhinia thonningii* Schum. J. Ethnopharmacol. 148:277–286.

Albaayit, S. F. A., Y. Abba, R. Abdullah, and N. Abdullah. 2016. Prophylactic effects of *Clausena excavata* Burum. f. leaf extract in ethanol-induced gastric ulcers. Drug Des. Devel. Ther. 10:1973–1986.

Al Batran, R., F. Al-Bayaty, M. M. Jamil Al-Obaidi, A. M. Abdualkader, H. A. Hadi, H. M. Ali, and M. A. Abdulla. 2013. *In vivo* antioxidant and antiulcer activity of *Parkia speciosa* ethanolic leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. PLoS One 8:e64751.

Al-Qarawi, A. A., H. Abdel-Rahman, B. H. Ali, H. M. Mousa, and S. A. El-Mougy. 2005. The ameliorative effect of dates (*Phoenix dactylifera* L.) on ethanol-induced gastric ulcer in rats. J. Ethnopharmacol. 98:313–317.

Al-Wajeeh, N. S., M. Hajerezaie, S. M. Noor, M. F. Halabi, N. Al-Henhena, A. H. S. Azizan, S. Kamran, P. Hassandarvish, A. N. Shwter, H. Karimian, H. M. Ali, and M. A. Abdulla. 2017. The gastro protective effects of *Cibotium barometz* hair on ethanol-induced gastric ulcer in Sprague-Dawley rats. BMC Vet. Res. 13:27.

Baiubon, P., P. Kunanusorn, P. Khonsung, N. Chiranthanut, A. Panthong, and C. Rujjanawate. 2016. Gastroprotective activity of the rhizome ethanol extract of *Zingiber simaoense* Y. Y. Qian in rats. J. Ethnopharmacol. 194:571–576.

Bie, Q., C. Sun, A. Gong, C. Li, Z. Su, D. Zheng, X. Ji, Y. Wu, Q. Guo, S. Wang, and H. Xu. 2016. Non-tumor

tissue derived interleukin-17B activates IL-17RB/AKT/β-catenin pathway to enhance the stemness of gastric cancer. Sci. Rep. 6:25447.

Boligon, A. A., R. B. de Freitas, T. F. de Brum, E. P. Waczuk, C. V. Klimaczewski, D. S. de Ávila, M. L. Athayde, and L. de Freitas Bauermann. 2014. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. Acta Pharm. Sin. B 4:358–367.

Cárdeno, A., M. Aparicio-Soto, S. Montserrat-de la Paz, B. Bermudez, F. J. G. Muriana, and C. Alarcón-de-la-Lastra. 2015. Squalene targets pro-and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. J. Funct. Foods 14:779–790.

Chang, X., F. Luo, W. Jiang, L. Zhu, J. Gao, H. He, T. Wei, S. Gong, and T. Yan. 2015. Protective activity of salidroside against ethanol-induced gastric ulcer via the MAPK/NF-κB pathway *in vivo* and *in vitro*. Int. Immunopharmacol. 28:604–615.

Chauhan, A. K. and S. C. Kang. 2015. Therapeutic potential and mechanism of thymol action against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat model. Alcohol 49:739–745.

Chen, H., H. Liao, Y. Liu, Y. Zheng, X. Wu, Z. Su, X. Zhang, Z. Lai, X. Lai, Z. X. Lin, and Z. Su. 2015a. Protective effects of pogostone from Pogostemonis Herba against ethanol-induced gastric ulcer in rats. Fitoterapia 100:110–117.

Chen, T., Y. Mou, J. Tan, L. Wei, Y. Qiao, T. Wei, P. Xiang, S. Peng, Y. Zhang, Z. Huang, and Z. Ji. 2015b. The protective effect of CDDO-Me on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Int. Immunopharmacol. 25:55–64.

Chen, X. Y., H. M. Chen, Y. H. Liu, Z. B. Zhang, Y. F. Zheng, Z. Q. Su, X. Zhang, J. H. Xie, Y. Z. Liang, L. D. Fu, X. P. Lai, Z. R. Su, and X. Q. Huang. 2016. The gastroprotective effect of pogostone from Pogostemonis Herba against indomethacin-induced gastric ulcer in rats. Exp. Biol. Med. 241:193–204.

Cheng, Y. T., C. H. Wu, C. Y. Ho, and G. C. Yen. 2013. Catechin protects against ketoprofen-induced oxidative damage of the gastric mucosa by up-regulating Nrf2 *in vitro* and *in vivo*. J. Nutr. Biochem. 24:475–483.

Cheng, Y. T., S. L. Wu, C. Y. Ho, S. M. Huang, C. L. Cheng, and G. C. Yen. 2014. Beneficial effects of camellia oil (*Camellia oleifera* Abel.) on ketoprofen-induced gastrointestinal mucosal damage through upregulation of HO-1 and VEGF. J. Agric. Food Chem. 62:642–650.

Choi, Y. J., N. Kim, J. Y. Lee, R. H. Nam, J. H. Seo, S. Lee, H. J. Kim, Y. J. Choi, H. S. Lee, and D. H. Lee. 2015. Gastroprotective effects of PMK-S005 against ethanol-induced acute gastric damage in rats. Gut Liver 10:348–355.

Covas, M. I., V. Konstantinidou, and M. Fitó. 2009. Olive oil and cardiovascular health. J. Cardiovasc. Pharmacol. 54:477–482.

El-Naga, R. N. 2015. Apocynin protects against ethanol-induced gastric ulcer in rats by attenuating the upregulation of NADPH oxidases 1 and 4. Chem. Biol. Interact. 242:317–326.

Fard, A. A., M. Hajrezaie, F. A. Kadir, F. A. Sefideh, S. M. Salama, Z. A. Al-Najar, S. W. Qader, M. A. Alshawsh, and M. A. Abdulla. 2011. The effects of combined adiponectin-metformin on glucose and lipids levels in mice and acute Toxicity and anti-ulcerogenic activity of adiponectin against ethanol-induced gastric mucosal injuries in rat. Molecules 16: 9534–9552.

Goel, R., R. Maiti, and I. A. Tavares. 1996. Role of endogenous eicosanoids in the antiulcer effect of kaempferol. Fitoterapia 67:548–552.

Golbabapour, S., M. Hajrezaie, P. Hassandarvish, N. Abdul Majid, A. H. Hadi, N. Nordin, and M. A. Abdulla. 2013. Acute toxicity and gastroprotective role of M. pruriens in ethanol-induced gastric mucosal injuries in rats. Biomed. Res. Int. 2013:974185.

Halabi, M. F., R. M. Shakir, D. A. Bardi, N. S. Al-Wajeeh, A. Ablat, P. Hassandarvish, M. Hajrezaie, A. Norazit, and M. A. Abdulla. 2014. Gastroprotective activity of ethyl-4-[(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxybenzylidene) amino] benzoate against ethanol-induced gastric mucosal ulcer in rats. PLoS One 9:e95908.

Hamaishi, K., R. Kojima, and M. Ito. 2006. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. Biol. Pharm. Bull. 29:2206–2213.

Hsu, C. L., C. C. Hsu, and G. C. Yen. 2010. Hepatoprotection by freshwater clam extract against CCl_4-induced hepatic damage in rats. Amer. J. Chin. Med. 38:881–894.

Hunt, R., M. Camilleri, S. E. Crowe, E. M. El-Omar, J. G. Fox, E. J. Kuipers, P Malfertheiner, K. E. L. McColl, D. M. Pritchard, M. Rugge, A. Sonnenberg, K. Sugano, and J. Tack. 2015. The stomach in health and disease. Gut 64:1650–1668.

Jalilzadeh-Amin, G., V. Najarnezhad, E. Anassori, M. Mostafavi, and H. Keshipour. 2015. Antiulcer properties of *Glycyrrhiza glabra* L. extract on experimental models of gastric ulcer in mice. Iran J. Pharm. Res. 14:1163–1170.

Kamisah, Y., H. M. S. Qodriyah, K. H. Chua, and M. F. Nur Azlina. 2014. Vitamin E: A potential therapy for gastric mucosal injury. Pharm. Biol. 52:591–1597.

Kushima, H., C. A. Hiruma-Lima, M. A. Santos, E. Viana, M. Coelho-Ferreira, and A. R. M. Souza-Brito. 2005. Gastroprotective activity of *Pradosia huberi* on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulphydryls and nitric oxide. J. Ethnopharmacol. 101:61–67.

Lee, C. P. and G. C. Yen. 2006. Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed (*Camellia oleifera* Abel.) oil. J. Agric. Food Chem. 54:779–784.

Lee, C. P., P. H. Shih, C. L. Hsu, and G. C. Yen. 2007. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl_4-induced oxidative damage in rats. Food Chem. Toxicol. 45:888–895.

Liu, C. M., G. H. Zheng, Q. L. Ming, C. Chao, and J. M. Sun. 2013. Sesamin protects mouse liver against nickel-induced oxidative DNA damage and apoptosis by the PI3K-Akt pathway. J. Agric. Food Chem. 61:1146–1154.

Liu, X., L. Jia, Y. Gao, B. Li, and Y. Tu. 2014. Anti-inflammatory activity of total flavonoids from seeds of *Camellia oleifera* Abel. Acta. Biochim. Biophys. Sin. 46:920–922.

Luiz-Ferreira, A., M. Cola, V. Barbastefano, F. M. de-Faria, A. B. A. de Almeida, E. Farias-Silva, T. R. Calvo, C. A. Hiruma-Lima, W. Vilegas, and A. R. Souza-Brito. 2012. Healing, antioxidant and cytoprotective properties of *Indigofera truxillensis* in different models of gastric ulcer in rats. Int. J. Mol. Sci. 13:14973–14991.

Morikawa, T., N. Li, A. Nagatomo, H. Matsuda, X. Li, and M. Yoshikawa. 2006. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). J. Nat. Prod. 69:185–190.

Motawi, T. K., H. M. Abd Elgawad, and N. N. Shahin. 2008. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. J. Biomed. Sci. 15:405–412.

Mowat, A. M. and W. W. Agace. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. Nat. Rev. Immunol. 14:667–685.

Olatunji, O. J., H. Chen, and Y. Zhou. 2015. Anti-ulcerogenic properties of *Lycium chinense* mill extracts against ethanol-induced acute gastric lesion in animal models and its active constituents. Molecules 20:22553–22564.

Olivares, M., A. Neef, G. Castillejo, G. De Palma, V. Varea, A. Capilla, F. Palau, E. Nova, A. Marcos, I. Polanco, C. Ribes-Koninckx, L. Ortigosa, L. Izquierdo, and Y. Sanz. 2015. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. Gut 64:406–417.

Omar, H., N. Nordin, P. Hassandarvish, M. Hajrezaie, A. H. S. Azizan, M. Fadaeinasab, N. Abdul Majid, M. A. Abdulla, N. Mohd Hashim, and H. Mohd Ali. 2017. Methanol leaf extract of *Actinodaphne sesquipedalis* (Lauraceae) enhances gastric defense against ethanol-induced ulcer in rats. Drug Des. Devel. Ther. 11:1353–1365.

Ribeiro, A. R. S., P. B. F. Diniz, M. S. Pinheiro, R. L. C. Albuquerque-Júnior, and S. M. Thomazzi. 2016. Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K^+ channels, and gastric mucus secretion. Chem. Biol. Interact. 244:121–128.

Rodrigues, H. G., M. A. R. Vinolo, J. Magdalon, K. Vitzel, R. T. Nachbar, A. F. Pessoa, M. F. dos Santos, E. Hatanaka, P. C. Calder, and R. Curi. 2012. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. J. Invest. Dermatol. 132:208–215.

Rujjanawate, C., D. Kanjanapothi, D. Amornlerdpison, and S. Pojanagaroon. 2005. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. J. Eethnopharmacol. 102: 120–122.

Sang, S., J. D. Lambert, C. T. Ho, and C. S. Yang. 2011. The chemistry and biotransformation of tea constituents. Pharmacol. Res. 64:87–99.

Shi, H. and F. Y. Wang. 2017. Protective effects of bilobalide against ethanol-induced gastric ulcer *in vivo*/*vitro*. Biomed. Pharmacother. 85:592–600.

Shin, I. S., W. Y. Jeon, H. K. Shin, S. W. Cha, and M. Y. Lee. 2013. Banhabaekchulchunma-tang, a traditional herbal formula attenuates absolute ethanol-induced gastric injury by enhancing the antioxidant status. BMC Complement. Alternat. Med. 13:170.

Sofidiya, M. O., C. O. Orisaremi, I. Sansaliyu, and T. O. Adetunde. 2015. Gastroprotective and antioxidant potentials of ethanolic stem bark extract of *Margaritaria discoidea* (Euphorbiaceae) in rats. J. Ethnopharmacol. 171:240–246.

Su, M. H., M. C. Shih, and K. H. Lin. 2014. Chemical composition of seed oils in native Taiwanese *Camellia* species. Food Chem. 156:369–373.

Tu, P. S., Y. T. Tung, W. T. Lee, and G. C. Yen. 2017. Protective effect of camellia oil (*Camellia oleifera* Abel.) against ethanol-induced acute oxidative injury of the gastric mucosa in mice. J. Agric. Food Chem. 65:4932–4941.

Wang, J., Y. T. Liu, L. Xiao, L. Zhu, Q. Wang, and T. Yan. 2014. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-κB pathway. Inflammation. 37:2085–2090.

World Health Organization. 2014. Global status report on alcohol and health 2014. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 376 pp.

Yang, W. S., J. Ko, E. Kim, J. H. Kim, J. G. Park, N. Y. Sung, H. G. Kim, S. Yang, H. S. Rho, Y. D. Hong, S. S. Shin, and J. Y. Cho. 2014. 21-O-angeloyltheasapogenol E3, a novel triterpenoid saponin from the seeds of tea plants, inhibits macrophage-mediated inflammatory responses in a NF-κB-dependent manner. Mediators of Inflamm. 2014:658351.

Yao, J. 2015. Tiao He Yi Wei granule, a traditional Chinese medicine, against ethanol-induced gastric ulcer in mice. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015:647283.

Ye, Y., H. T. Xing, and Y. Guo. 2013. Hypolipidemic effect of a novel biflavonoid from shells of *Camellia oleifera* (Abel.). Indian J. Exp. Biol. 51:458–463.

Zhao, Z., S. Gong, S. Wang, and C. Ma. 2015. Effect and mechanism of evodiamine against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing Rho/NF-κB pathway. Int. Immunopharmacol. 28:588–595.

The Study of Camellia Oils from Different Process Conditions for Gastric Health Protection

Wei-Ting Lee[1], Ya-Lin Lee[2], Yu-Tang Tung[3], Chun-Ching Wu[1], and Gow-Chin Yen[4,*]

Abstract

Lee, W. T., Y. L. Lee, Y. T. Tung, C. C. Wu, and G. C. Yen. 2019. The study of camellia oils from different process conditions for gastric health protection. J. Taiwan Agric. Res. 68(1):1–15.

The gastrointestinal disorders such as peptic ulcer become a common problem nowadays, which is due to the dietary habit changes, stressed lives and alcoholism. Camellia oil is commonly used in Taiwan and has been shown with healthy effects for gastrointestinal tract in folk medicine. Our previous study has been demonstrated that camellia oil could prevent the gastric mucosal damage caused by ethanol. This study was aimed to further confirm whether the effects of different sources or processes of camellia oils have the same effect. In this study, the rat normal gastric surface mucous cell line (RGM-1) cells and BALB/c mice were used in ethanol-induced gastric mucosal damage model. The results indicated that the ethanol-induced RGM-1 cell mortalities were significantly increased in those pretreated with camellia oils, and the oil with the highest bioactivity was chosen for further animal experiment. Animal experiments showed that ethanol (5 mL kg^{-1} B.W.) induction for an hour can cause gastric mucosal injury. However, pretreatment of mice with camellia oil (1 mL kg^{-1} B.W. and 2 mL kg^{-1} B.W.) for 3 wk or lansoprazole (30 mg kg^{-1} B.W.) for 1 wk effectively improved ethanol-induced gastric injury, enhanced mucosal mucus secretion, antioxidant enzyme activities including catalase, glutathione *S*-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GRd), and alleviated inflammatory cytokines by suppressing the production of COX-2 and IL-1β induced by ethanol in gastric tissue. In conclusion, the camellia oil could alleviate the ethanol-induced gastric injury by reducing oxidative damage and inflammation. The results of this study can be applied to develop the gastrointestinal-related functional products in the future, and thereby enhance the values of indigenous agricultural products.

Key words: Camellia oil, Peptic ulcer, Ethanol, Inflammatory cytokines.

Received: March 19, 2018; Accepted: July 12, 2018.

[*] Corresponding author, e-mail: gcyen@nchu.edu.tw
[1] Graduate Students, Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Professor, Graduate Institute of Metabolism and Obesity Sciences, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan, ROC.
[4] Professor, Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(1):16–27 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201903_68(1).0002 研究報告

建立馬鈴薯多重聚合酶連鎖反應檢測技術

杜元凱[1] 馮昱維[2] 陳烈夫[3] 陳述[4] 林彥君[5] 陳涵葳[1,*]

摘要

杜元凱、馮昱維、陳烈夫、陳述、林彥君、陳涵葳。2019。建立馬鈴薯多重聚合酶連鎖反應檢測技術。台灣農業研究 68(1):16–27。

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 為我國常見的食用及加工作物，其塊莖在工業和飼料上具有很高的應用價值。本試驗以馬鈴薯物種專一性 (taxon-specific) 內生性基因尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase; UGPase) 序列與基因轉殖馬鈴薯品項之專一性序列 (event-specific sequence) 建立多重聚合酶連鎖反應 (multiplex polymerase chain reaction; mPCR) 檢測技術。結果顯示，經多重聚合酶連鎖反應可正確增幅出目標片段，且混合 2 或 3 個不同轉殖品項之 DNA 樣本，亦能檢出專一性目標片段；單一基因轉殖品項之稀釋樣本檢測其最低檢測極限 (limit of detection; LOD)，本方法之檢測靈敏度可達 0.5%。將本方法送至 4 個不同的試驗單位進行能力試驗，結果亦顯示具備良好穩定性與再顯性。另外，本試驗以快速馬鈴薯核酸萃取方法並利用毛細管電泳分析目標片段，可大幅縮減檢測流程所耗時間、人力成本，期望能應用於馬鈴薯檢測技術開發與基因改造 (基改) 馬鈴薯轉殖品項檢驗方法之參考。

關鍵詞：馬鈴薯、多重聚合酶連鎖反應、檢驗方法。

前言

依據 2016 年國際農業生物技術應用推廣協會 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications; ISAAA) 統計資料顯示，全球共有 26 個國家種植基因改造作物，栽培面積總計 1.85 億公頃 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications 2016)。目前基因改造 (基改) 食品原料包括大豆、玉米、油菜與甜菜等品項已在台灣流通，並以種子、初級加工或高級加工食品的形態輸入，在製造、加工、調配、包裝、儲運及販賣過程中，可能發生有意或無意混雜風險。由於基改作物及其產品對於生態環境及人體健康的影響仍有疑慮，各國對於基因改造食品標示資訊規範不盡相同。目前台灣採強制標示，根據「包裝食品含基因改造食品原料標示應遵行事項」、「食品添加物含基因改造食品原料標示應遵行事項」及「散裝食品含基因改造食品原料標示應遵行事項」所訂，含基因改造食品原料之包裝食品、食品添加物及散裝食品皆需標示「基因改造」或「含基因改造」字樣。而非基因改造食品原料，其非故意摻雜率不得超過 3%，如超過則需標示「基因改造」等字樣。在醬油、大豆沙拉油等高層次加工品方面，亦須加註原料來源是否為基改作物。此外，其他國家非故意摻雜含量的標示界線，日本訂為 5%，歐盟為 0.9%，美國與加拿大則並未訂定強制標誌之管理法規 (Carter & Gruère 2006)。

投稿日期：2018 年 5 月 23 日；接受日期：2018 年 8 月 27 日。
[*] 通訊作者：swaychen@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 大武鄉公所農業觀光課技士。台灣 台東縣。
[3] 農委會農業試驗所技術服務組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所作物種原組副研究員。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

為了有效管理基改作物及其產品，需建立快速、高專一性、高敏感性的基改檢測方式，以區分基改作物轉殖品項 (event)。目前常用的基改轉殖品項檢測技術以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 為基礎，配合插入受體植物的外源基因與構築序列，或是涵蓋外來構築序列與作物基因體序列的邊界序列 (flanking sequence) 設計引子對，作為篩選基改轉殖品項之主要檢測依據 (Lipp *et al*. 2001)。目前發展出的基改檢測技術，如即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 屬於定量檢測技術，而一般 PCR 或多重聚合酶連鎖反應 (multiplex mPCR) 為定性檢測方法。近年來也發展了多種新興檢測技術，如環形恆溫核酸增幅反應 (Loop mediated isothermal amplification; LAMP)、數位 PCR (digital PCR; dPCR)、基因微陣列晶片 (DNA microarray) 等，縮短反應時間並提升檢測精確度 (Fraiture *et al*. 2015)。

馬鈴薯為全球重要糧食作物之一，僅次於小麥、玉米、稻米等，且年均產量均呈現上升趨勢。基改馬鈴薯在工業和飼料上具有很高的應用價值；如 BASF 公司推出商業種植基改馬鈴薯轉殖品項 BPS-25271-9 (EH92-527-1)、AM04-1020 及 AV43-6-G7 等，利用基因默化 (gene silencing) 技術，轉入馬鈴薯內生性基因顆粒結合澱粉酶 (granule bound starch synthase; GBSS) 的反義 RNA (antisense RNA) 片段來抑制基因表現，提高馬鈴薯轉殖系薯球支鏈澱粉含量，可供造紙及工業用澱粉生產，節省分離支鏈澱粉與直鏈澱粉的工序，降低製造成本 (European Commission 2010b)；中研院余淑美研究員以 sporamin (SPO) 啟動子、*Escherichia coli* 植酸酶 (phytase) 基因 acid phosphatase A (appA) 與 nopaline synthase (NOS) 終結子之融合基因，轉殖至馬鈴薯基因體中，並篩選出具高效能植酸酶活性的基改轉殖系 2-1，作為動物飼料添加劑可提高磷的轉化率，減輕畜牧業的磷排放 (Hong *et al*. 2008)。隨著基改馬鈴薯在全球的重要性增加，雖然台灣尚未許可基改馬鈴薯的進口與栽培，但管理單位對基改馬鈴薯之檢監測預警工作不可輕忽。

本試驗以 EH92-527-1、AM04-1020 及 2-1 等 3 種基改馬鈴薯轉殖品項作為試驗材料，依據其個別轉殖品項之邊界序列設計專一性引子對。另以馬鈴薯內生性基因尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase; UGPase) 之保守性序列設計引子對，作為馬鈴薯物種專一性 (taxon-specific) 檢測目標，建立基改馬鈴薯 mPCR 檢測方法，達到縮短實驗時間與節省成本。此外，本試驗同時應用植物基因體 DNA 快速萃取法與毛細管電泳分析技術，可快速且正確地判斷上述 3 種基改馬鈴薯轉殖品項，由此建立一快速檢測基改馬鈴薯的檢測流程。

材料與方法

植物材料

本試驗之基因改造作物轉殖品項標準品皆購自 Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)，包括：(1) 馬鈴薯轉殖品項 EH92-527-1 塊莖粉末之非基改標準品 ERM®-BF421a (0%, blank) 與基改標準品 ERM®-BF421b (100%)；(2) 馬鈴薯轉殖品項 AM04-1020 塊莖粉末之非基改標準品 ERM®-BF430a (0%, blank) 與基改標準品 ERM®-BF430b (100%)；(3) 大豆轉殖品項 DP-305423-1 種子粉末之非基改標準品 ERM®-BF426a (0%, blank)；(4) 玉米轉殖品項 Bt176 種子粉末之基改標準品 ERM®-BF411f (5%)。基改馬鈴薯轉殖品項 2-1 為品種「克尼伯」(‘Kennebec’) 之轉殖株，由中央試驗院分子生物試驗所余淑美院士提供 (台灣台北市) (Hong *et al*. 2008)；非基改馬鈴薯品種克尼伯則購買自種苗改良繁殖場，作為轉殖品項 2-1 的對照組。克尼伯與轉殖品項 2-1 植株材料，由本實驗室自行繁殖後，收取塊莖凍乾保存於 4℃備用。

植物基因體 DNA 萃取

本試驗共使用兩種植物基因體 DNA 萃取方法：(1) 以 GeneMark Plant Genomic DNA Purification Kit (GMbiolab，台灣台中市)，取 0.1 g 標準品粉末或磨碎的塊莖萃取植物基因

體 DNA，純化後的 DNA 樣本回溶於 40 µL 無菌水中保存於 -20℃備用；(2) 修改自 Hosaka (2004) 之植物基因體 DNA 快速萃取方法，取 0.1 g 之塊莖與 500 µL extraction buffer (EB) 緩衝液 [100 mM Tris-Hcl, pH 8.0; 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0; 500 mM NaCl; 1.25% sodium dodecyl sulfate (SDS); 0.2% 2-mercaptoethanol] 混合後壓碎，吸取 100 µL 混合液至滅菌離心管後，再加入 32 µL 5M potassium acetate。離心 10 s，取 10 µL 上清液與 240 µL 無菌水混合後，保存於 -20℃備用。樣本基因體 DNA 萃取後，均經 NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) 測量濃度，再定量成 100 ng μL^{-1} 做後續 PCR 分析。

PCR 引子設計

本試驗使用之 PCR 引子可分為 2 種，其一是用於檢測馬鈴薯內生性基因 UGPase 之引子對，另一類則依照 3 種基改馬鈴薯轉殖品項之邊界序列做設計，偵測各別轉殖品項獨有的專一性序列片段。馬鈴薯 UGPase 基因序列根據 NCBI 網站資料庫 (GenBank: U20345.1)，挑選含 UGPase 基因序列，可由 UGP-mF (5’-CTCTGTGGTGGACAAGCTGAGGGAAGC-3’) 與 UGP-mR (5’-GTCTAATCACCTCTTCCCAATACTTCTTG-3’) 引子對增幅得到 161 bp 片段。EH92 與 AM04 轉殖品項，分別依據其外源基因插入植物基因體 DNA 位置，挑選 3’ 端與 5’ 端邊界序列設計專一性引子對 (Hofvander 2005; Geiger *et al*. 2012)。序列為 EH-mF (5’-TTATTTGGATTGAGAGTGAATATGAGAC-3’) 與 EH-mR (5’-ATTTACAATTGAAACAAGGAGTCATAAG-3’)，可增幅得到 EH92 轉殖品項專一之 450 bp 片段；以及 AM-mF (5’-AAATACGTGTCTACAGCCATATAAACAG-3’) 與 AM-mR (5’-GTTAAGTAATGAACAAAACGGAGTAAC-3’)，可增幅得到 AM04 轉殖品項專一之 238 bp 片段。轉殖品項 2-1，根據本實驗室先前定序資料確認外源序列插入位置，於 5’ 端邊界序列設計引子，序列為 2-1 flanking F1 (5’-TCAGACAACCTTTTAAGATTTTTGGTT-3’) 與 2-1 flanking R1 (5’-TAAAATCCAGATCCCCCGAATTA-3’)，可增幅馬鈴薯 2-1 轉殖品項專一之 357 bp 片段。所有引子皆委託每得科技有限公司 (台灣桃園市) 合成，保存於 -20℃備用。

mPCR 反應條件

mPCR 總反應體積為 20 µL，包含 100 ng 基因體 DNA、0.4 µM EH92 引子對、0.4 µM AM04 引子對、0.2 µM 2-1 引子對、0.05 µM UGPase 引子對、Taq DNA Polymerase 2X Master Mix RED (1.5 mM $MgCl_2$) (AMPLIQON, Odense, Denmark)；反應液混合均勻後，進行 PCR (C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，條件為 94℃前處理 5 min。接續以 94℃變性處理 30 s、62℃處理 30 s、72℃反應 27 s，共計 37 個循環，最後以 72℃處理 7 min 後終止反應。PCR 增幅產物以 1.5% 瓊脂膠體分離增幅片段，並以 ethidium bromide (EtBr) 進行膠體染色，或利用毛細管電泳儀 (Qsep100 DNA Analyzer, Bioptic Inc., La Cañada Flintridge, CA, USA) 分析增幅片段。

mPCR 能力試驗

將 mPCR 反應溶液、預先混合之引子對與 6 個待測樣本 (包含轉殖品項 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 之基因體 DNA 樣本)，以及無菌水做負對照組，隨機標示為 1–7 號，分別委託行政院農業委員會農業試驗所 (Taiwan Agricultural Research Institute; TARI) 種原組、種苗改良繁殖場 (Taiwan Seed Improvement and Propagation Station; TSS)、桃園區農業改良場 (Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station; TYDARES)、台南區農業改良場 (Tainan District Agricultural Research and Extension Station; TNDAIS) 共 4 個單位進行盲樣試驗，以同級品試劑與 PCR 儀器進行 PCR 反應，並回覆分析結果。

結果

mPCR 專一性 (specificity) 分析

為了檢測不同基改馬鈴薯轉殖品項，本試驗萃取基改馬鈴薯轉殖品項 EH92-527-1 與

AM04-1020 之 0% 與 100% 塊莖粉末標準品基因體 DNA，再將含 100% 標準品與 0% 標準品之基因體 DNA 樣本，配製成 10% (v/v) EH92 與 AM04 之 DNA 樣本；轉殖品項 2-1，則分別萃取 2-1、未轉殖克尼伯之塊莖基因體 DNA，配製 10% (v/v) 之 2-1 轉殖品項 DNA 樣本。本試驗另挑選兩種非馬鈴薯物種轉殖品項 (DP-305423-1、Bt176) 粉末標準品萃取其 DNA，作為對照樣本。經 mPCR 增幅後 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 等 3 個轉殖品項之 10% 基改 DNA 樣本，可分別增幅 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp) 及 2-1 (357 bp) 之目標片段 (圖 1)，且所有馬鈴薯基因體 DNA 樣本皆可增幅馬鈴薯內生性基因 UGPase (161 bp) 片段。而大豆與玉米兩轉殖品項之基因體 DNA 樣本，則無任何片段產生，顯示 mPCR 檢測方法可鑑別不同物種及轉殖品項。另外，本試驗將 3 種基改馬鈴薯樣本進行混合，評估 mPCR 檢測方法是否能區分不同轉殖品項之混合樣本，混合樣本分別為 (1) 個別轉殖品項之 10% 與 0% 單一樣本；(2) 2 個基改馬鈴薯轉殖品項10%基改樣本之等比例混合樣本 (EH92 與 AM04、EH92 與 2-1、AM04 與 2-1)；(3) 3 個基改馬鈴薯轉殖品項 10% 基改樣本之等比例混合樣本 (EH92、AM04 與 2-1)，總共 10 個樣本作為檢測。試驗結果 (圖 2A) 得知，僅含單一轉殖品項之 DNA 樣本 (lane 1–6)，可分別準確辨認出個別基改轉殖品項 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp) 與 2-1 (357 bp) 之目標片段，而 2 個轉殖品項之等比例混合樣本 (lane 7–9) 與 3 個轉殖品項等比例混合樣本 (lane 10)，亦可同時增幅出所混合的轉殖品項目標片段，且所有馬鈴薯樣本皆可判別出內生性 UGPase (161 bp) 目標片段 (lane 1–10)。結果顯示，本試驗之 mPCR 檢測方法，可準確判斷轉殖品項並對混合樣本檢測具有高度專一性。

簡易快速萃取基因體 DNA 配合 mPCR 分析

為縮短檢測作業時間，本試驗參照 Hosaka (2004) 利用快速萃取法將轉殖品項 EH92-527-1 及 AM04-1020 之塊莖粉末標準品、轉殖品項2-1及對照組克尼伯植株塊莖各取約0.1 g 萃取基因體 DNA，萃取結果經 Nanodrop 1000 測量濃度範圍在 25–200 ng μL^{-1}，純度

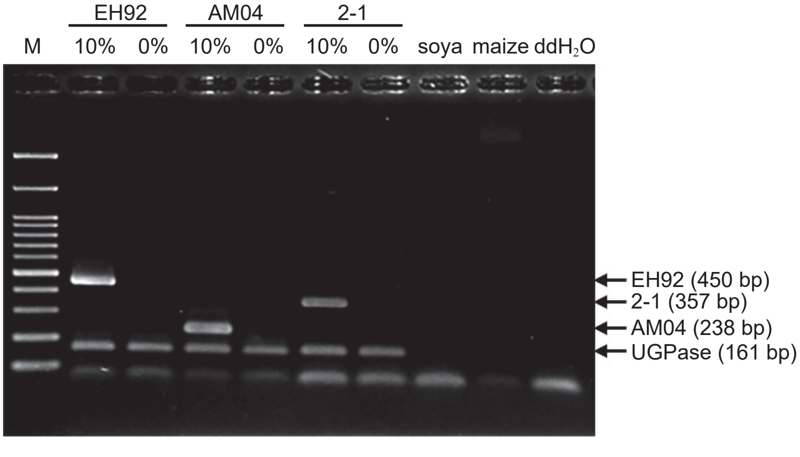

圖 1. 轉殖品項及作物專一性試驗電泳圖，各樣本分別為馬鈴薯 EH92、AM04 及 2-1 等 3 個轉殖品項之基因改造 (基改) (10%) DNA 樣本與非基改 (0%) DNA 樣本，與大豆、玉米之 DNA 樣本，利用 multiplex polymerase chain reaction (mPCR)，同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) 4 個目標片段。

Fig. 1. The results of specificity test of primers among events and species. The samples of 10% and 0% genetically modified (GM) potato (EH92-527-1, AM04-1020, 2-1), soybean, and maize were used and four target sequences including EH92 (450 bp), AM04 (238 bp), 2-1 (357 bp), and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) were detected by multiplex polymerase chain reaction (mPCR) simultaneously.

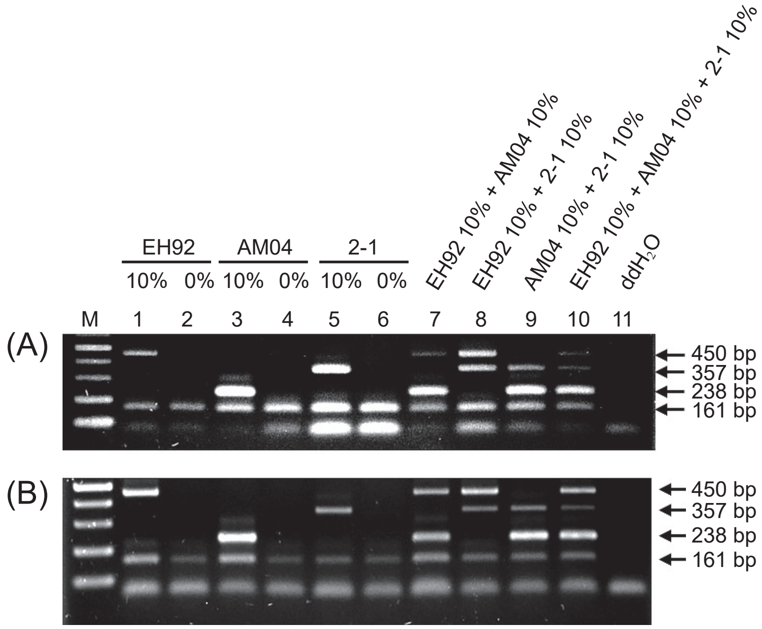

圖 2. 基因改造 (基改) 馬鈴薯混合樣本之 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) 檢測結果。(A) 以商品化套組萃取 DNA 方法配合 mPCR 檢測電泳圖；(B) 快速萃取 DNA 方法配合 mPCR 檢測電泳圖。利用 mPCR，同時檢測EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) 4 個目標片段，每個 Lane 總 DNA 量皆為 100 ng。

Fig. 2. The results of mixed samples among genetically modified (GM) potato events. (A) DNA samples extracted by commercial kit. (B) DNA samples using DNA rapid extraction method. Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) was utilized to detect four target sequences simultaneously, including EH92 (450 bp), AM04 (238 bp), 2-1 (357 bp), and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp). Each lane contained 100 ng DNA.

(A_{260}/A_{280}) 範圍在 1.6–2.1 之間，DNA 品質略遜於商品化套組之萃取結果。利用簡易快萃法萃取之 DNA 進行 mPCR 分析 (圖 2B)，結果 3 種 10% 單一樣本皆可增幅出個別 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp) 及 2-1 (357 bp) 目標片段，10% 單一樣本及非基改樣本皆可辨識內生性基因 UGPase (161 bp) 目標片段 (lane 1–6)；而 2 種轉殖品項之等比例混合樣本 (EH92 與 AM04、EH92 與 2-1、AM04 與 2-1) 與 3 種轉殖品項之等比例混合樣本，均可辨識出個別轉殖品項專一性目標片段與內生性基因 UGPase 目標片段 (lane 7–10)，顯示本試驗之 mPCR 反應條件適用於大多數 DNA 品質，無需經過特別純化。

mPCR 靈敏度 (sensitivity) 評估

將 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 三個轉殖品項基改 DNA 樣本與其對應之非基改 DNA 樣本，依不同比例混合配製為 100、10、4、1、0.9、0.5 及 0% 各 7 個樣本，所有樣本基因體 DNA 於 mPCR 反應均為 100 ng，以評估本試驗 mPCR 檢測法之最低偵測極限 (limit of detection; LOD)。電泳分析結果 (圖 3) 顯示，在 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 三轉殖品項組別中，於 100、10、4、1、0.9 及 0.5% 皆可順利增幅個別轉殖品項之專一性目標片段 (lane 1–5)，且所有具馬鈴薯基因體 DNA 樣本皆可觀察到內生性 UGPase (161 bp) 目標片段，而各組別之正控制組 (lane 7–8) 也能清楚的觀察到其目標片段，故由此判斷其LOD皆為0.5%。

毛細管電泳結果

本試驗以毛細管電泳分析 mPCR 之結果，其中EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UGPase (161 bp) 等 4 個目標片段移動時間 (migration time)，分別約為 3.9、3.7、3.1

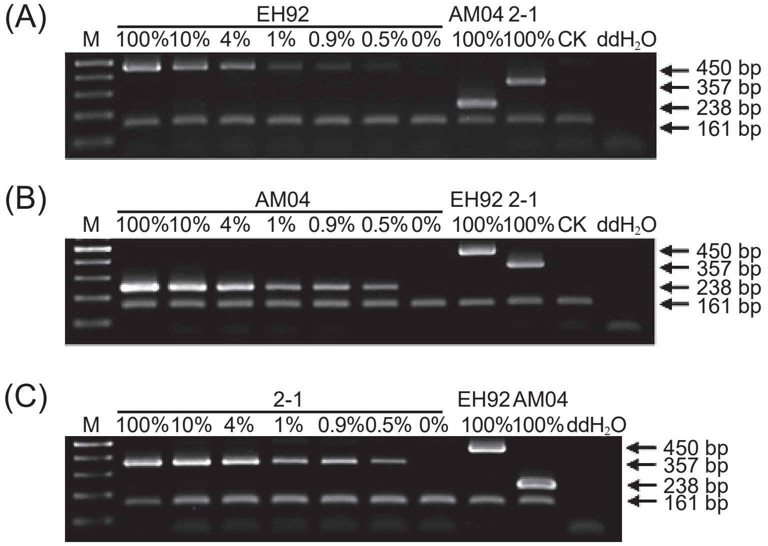

圖 3. 不同轉殖品項最低偵測極限。以 100% 及 0% 不同轉殖品項 DNA 配製 100、10、4、1、0.9、0.5 及 0% 樣本，利用基因改造 (基改) 馬鈴薯 multiplex polymerase chain reaction (mPCR)，同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) 四個目標片段。以轉殖品項 EH92 之基改 (100%) 及非基改 (0%) DNA 調配不同比例 DNA 樣本，轉殖品項 AM04、2-1 與 CK 之 DNA 樣本為 Positive control，ddH$_2$O 為 Negative control (A)。以轉殖品項 AM04 之基改 (100%) 及非基改 (0%) DNA 調配不同比例 DNA 樣本，轉殖品項 EH92、2-1 與 CK 之 DNA 樣本為 Positive control，ddH$_2$O 為 Negative control (B)。以轉殖品項 2-1 之基改 (100%) 及非基改 (0%) DNA 調配不同比例 DNA 樣本，轉殖品項 EH92、AM04 之 DNA 樣本為 positive control，ddH$_2$O 為 negative control (C)。

Fig. 3. The results of limitation of detection (LOD) among strains. Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) was used to detect four target sequences simultaneously, including EH92 (450 bp), AM04 (238 bp), 2-1 (357 bp), and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) in 100, 10, 4, 1, 0.9, 0.5, and 0% genetically modified (GM), respectively, that contained samples made by 100% and 0% GM containing samples among strains. The results of 100, 10, 4, 1, 0.9, 0.5, and 0% GM containing samples of EH92. 100% AM04, 2-1 and CK were assigned as the positive control and ddH$_2$O was assigned as the negative control (A). The result of 100, 10, 4, 1, 0.9, 0.5, and 0% GM containing samples of AM04. 100% EH92, 2-1 and CK were assigned as the positive control and ddH$_2$O was assigned as the negative control (B). The results of 100, 10, 4, 1, 0.9, 0.5, and 0% GM containing samples of 2-1. 100% AM04, EH92 and CK were assigned as the positive control and ddH$_2$O was assigned as the negative control (C).

及 2.8 min。以 3 種轉殖品項等比例混合之混合樣本經 mPCR 反應後，分析結果可明顯觀察 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UGPase (161 bp) 檢測訊號 (圖 4A)；非基改馬鈴薯克尼伯經 mPCR 反應後分析，僅出現 UGPase (161 bp) 檢測訊號 (圖 4B)；使用去離子水 (負對照組) 之增幅結果，在 4 個相對應位置無任何檢測訊號出現 (圖 4C)。

mPCR 能力試驗

為增加試驗可信度，避免人為操作或實驗環境影響結果，本實驗室委託 4 個單位，將不同馬鈴薯轉殖品項之 10% 基改 DNA 樣本、0% 非基改 DNA 樣本與負對照組共 7 個樣本，依照相同引子對與溫度條件作 mPCR 檢測，盲樣試驗回傳資料檢測結果均一致 (表 1)。各檢測單位結果，皆可正確增幅轉殖品項 EH92 (450bp)、AM04 (238 bp) 及 2-1 (357 bp) 之目標片段以及馬鈴薯內生性 UGPase (161 bp) 片段 (圖 5)，顯示 mPCR 具有良好的穩定性與再現性。

討論

隨著世界基改作物種植面積與轉殖品項的日益增加，對監控食品組成或飼料是否含有特

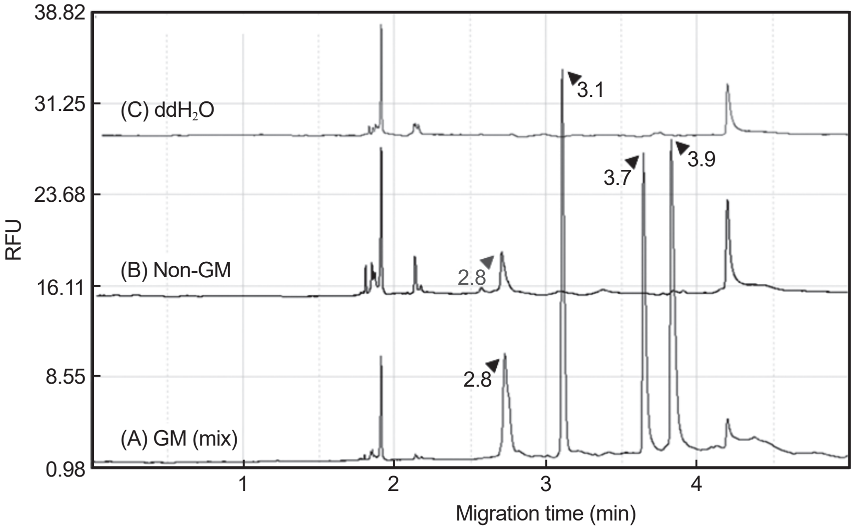

圖 4. 待測樣本經 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) 後使用毛細管電泳分析結果。混合樣本為 EH92-527-1、AM04-1020、2-1 轉殖品項 (A)；非基因改造 (基改) 馬鈴薯 (「克尼伯」) (B)；水：負對照組 (C)。

Fig. 4. Examination of samples after multiplex polymerase chain reaction (mPCR) by using capillary electrophoresis. The concentration of each sample was 100 ng. The sample was mixed equally with EH92-527-1, AM04-1020 and 2-1 genomic DNA (A). The nongenetically modified (GM) potato (‘Kennebec’) (B). Negative control: deionized water (C).

表 1. 基因改造 (基改) 馬鈴薯 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) 盲樣試驗結果表，重複數為 4。

Table 1. The blind test of genetically modified (GM) potato using multiplex polymerase chain reaction (mPCR). Each result contained 4 replications.

	EH92		AM04		2-1	
Item	10%	0%	10%	0%	10%	0%
EH92	+[z]	−	−	−	−	−
AM04	−[z]	−		−	−	−
2-1	−	−	−	−	+	−
UGPase	+	+	+	+	+	+

[z] +: positive results for the four replicates (TARI, TSS, TYDARES, TNDAIS); −: negative results for the four replicates (TARI, TSS, TYDARES, TNDAIS). UGPase: UDP-glucose pyrophosphorylase; TARI: Taiwan Agricultural Research Institute; TSS: Taiwan Seed Improvement and Propagation Station; TYDARES: Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station; TNDAIS: Tainan District Agricultural Research and Extension Station.

定基改作物，需要簡單、快速的檢測方法。現行基改作物檢測方式主要以 Real-time PCR 來進行，但 Real-time PCR 反應使用之試劑、探針及耗材成本花費較高，且實驗儀器取得與維護費用部分遠高於一般 PCR。相較之下 mPCR 與一般 PCR 皆須以電泳分析反應結果，然而 mPCR 因單一反應可偵測多個目標，可大幅減少配置與分析時間，且操作上較為簡便，應為較有效率的檢測方法。

mPCR 目前已成功運用在不同基改作物 (如棉花、玉米、大豆) 之分析及檢測 (Ahn *et al*. 2008; Kim *et al*. 2008; Kim *et al*. 2009)，本試驗嘗試建立馬鈴薯的 mPCR 檢測方法，結果顯示可在單一反應同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 共 3 個基改馬鈴薯轉殖品項之專一性序列片段。另以馬鈴薯內生性序列之 UGPase (161 bp) 片段作為對照基因，以避免 PCR 產生偽陰性結果

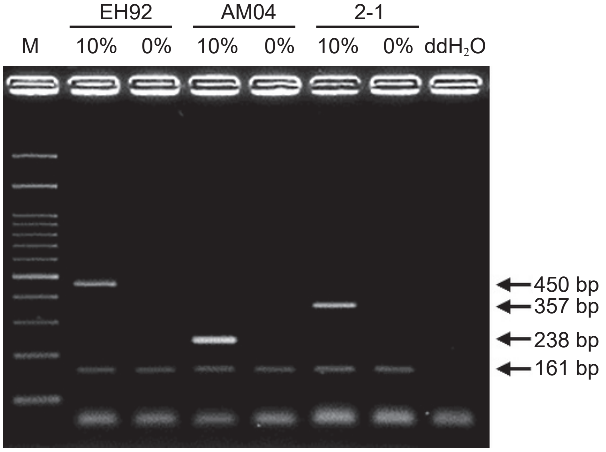

圖 5. 基因改造 (基改) 馬鈴薯 multiplex polymerase chain reaction (mPCR) 盲樣試驗電泳圖，同時檢測 EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 及 UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp) 四個目標片段。

Fig. 5. The electrophoresis results of the blind test of genetically modified (GM) potato. Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) was used to detect four target sequences simultaneously, including EH92 (450 bp), AM04 (238 bp), 2-1 (357 bp) and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (161 bp).

之誤判。專一性序列片段，是依據各轉殖品項在外源基因插入基因體序列後，取插入位置其外源基因部分序列與作物基因體序列，此區域稱邊界序列，對各轉殖品項而言為獨一無二。而 UGPase 片段為馬鈴薯內生性基因序列，主要表現於馬鈴薯塊莖，並已證實為在馬鈴薯基因體中為單一插入序列拷貝 (Borovkov *et al*. 1997)；Watanabe *et al*. (2004) 試驗中依據 NCBI 資料庫 UGPase 基因設計引子對，針對馬鈴薯擴增出目標片段，且屬於茄科的番茄與茄子皆無偵測到 UGPase 基因片段，故可作為馬鈴薯物種專一性檢測對象。依據本試驗 mPCR 結果顯示，EH92 (450 bp)、AM04 (238 bp)、2-1 (357 bp) 僅在各馬鈴薯轉殖品項出現專一性片段，可作為確認檢體中是否具有基改馬鈴薯轉殖品項；而 UGPase (161 bp) 片段則僅於馬鈴薯作物樣本出現，於基改大豆、玉米則無觀察，說明本 mPCR 具備相當之專一性。能力試驗結果亦說明，本 mPCR 方法在個別 4 個實驗室不同操作人員與環境下，待測樣本均可準確觀察到對應的目標片段，顯示具有良好的穩定性與再現性。然而 mPCR 仍存在許多問題需要克服，首先多組引子於同一反應下會相互競爭或因相似性太高使彼此相互黏合 (annealing)，影響 PCR 效率與專一性。此外，若不同引子間的鏈解溫度 (melting temperature; Tm) 差異過大，容易造成引子不易與 DNA 黏合使某些目標片段較為微弱，或是易與 DNA 發生非專一性黏合而產生非專一性條帶 (Henegariu *et al*. 1997)。因此設計目標序列時，需考慮引子對濃度與 Tm 值，並利用溫度梯度找出反應的最適合溫度。本試驗 mPCR 條件經多次修改優化後，於使用 3 個轉殖品項與兩兩轉殖品項混合進行 mPCR 分析，皆可順利觀察混合樣本產生對應的目標條帶，而負對照組並無出現非專一性產物，代表具良好再現性及高度特異性。

為節省檢測時間與成本，本試驗利用 mPCR 配合簡易快速萃取方法與毛細管電泳，建立馬鈴薯簡化檢測技術流程。由於馬鈴薯主要以塊莖作常態保存，本試驗除參照 Hosaka (2004) 的快速萃取法使用葉片萃取基因體 DNA 外，亦使用塊莖萃取基因體 DNA，在先前預備試驗測試結果顯示，經 mPCR 分析無論是葉片或塊莖萃取之基因體 DNA 皆能擴增目標片段。本試驗使用快速萃取法於 5 min 內可操作完畢，雖然品質與穩定性皆較市售套組略差，但經 mPCR 分析結果仍可清楚的顯示目標片段，證實此快速萃取法純化基因體 DNA 並用於檢測之可行性。另外，Rostamkhani *et*

al. (2011) 研究同時應用快速萃取法結合一般 PCR 及 LAMP 分析技術，用於開發基改棉花轉殖品項檢驗方法，可大幅縮短檢測時間與提高檢測靈敏度，代表快速萃取法可應用於不同檢測方法學之建立。本試驗另以毛細管電泳進行 mPCR 反應後之分析，可於 10 min 內獲取準確結果，除縮短電泳花費時間外，也可避免瓊脂膠體電泳使用 EtBr 或其他 DNA 染劑標示核酸，因而產生含染劑之實驗廢棄物。毛細管電泳法除可快速分析 PCR 產物外，因本身具備提供高解析度核酸片段分離能力，可克服 mPCR 增幅片段過於接近因而難以判斷的缺點。此外，毛細管電泳亦可自動化，已常見於基改作物檢測試驗 (Heide *et al*. 2008; Basak *et al*. 2014)。因此，透過快速萃取法配合毛細管電泳分析，可顯著減少檢測作業時間以加快檢測流程。

我國目前尚未核准基因改造馬鈴薯輸入，根據今年 6 月更新的「基因改造食品原料審議中案件清單」，目前美國 J. R. Simplot 公司所研發的 Innate 基改馬鈴薯 E12 與 Y9 轉殖品項已提出申請 (Taiwan Food and Drug Administration 2018)；而 EH92-527-1 基改馬鈴薯曾於 2010 年由歐盟核准作為工業和飼料上使用 (European Commission 2010a)，但由於審理程序上的疑慮與栽種面積一直無法提高，到了 2013 年歐盟法院以不合程序為由撤銷核准 (Dunmore 2013)。日後若我國開放基改馬鈴薯轉殖品項輸入，需依據馬鈴薯轉殖品項檢驗方法進行辨別與判斷。我國現行基因改造食品原料標示規定，含基改食品原料之包裝食品、食品添加物及散裝食品其非故意摻雜率不得超過 3%。本試驗利用 mPCR 檢測 3 個基改馬鈴薯轉殖品項 EH92-527-1、AM04-1020 及 2-1，符合法規所規定 3% 含量，最低偵測極限可達 0.5%，可有效檢測樣本是否具基改馬鈴薯成分。目前基改檢測管控以歐盟最為嚴格，其非故意摻雜率不得超過 0.9%，其聯合研究中心開發的檢測方法皆以 Real-time PCR 做為標準 (European Commission 2003)。雖然 Real-time PCR 有著高敏感性與快速的優點，但其分析及儀器成本較高為隱憂；而 mPCR 除可增加效率或降低費用外，更可透過單一反應使用多對引子組，同時增幅轉殖品項專一之目標片段，能有效鑑別出混合不同基改轉殖品項之樣本。因此，如能先利用 mPCR 進行定性檢測，確認樣本有無轉殖品項專一之目標片段後，再依據檢測結果輔以 Real-time PCR 檢測基改馬鈴薯之含量，可簡化操作流程並降低操作錯誤之機會，有助於建立基改馬鈴薯產品之原料追蹤與標示管理。

隨著基改作物產量及需求的上升，檢測工作勢必更加繁重，成本也會更加增加，因此如何快速、有效地進行檢測作業，並減少人力、時間成本為一重要課題。本試驗利用 mPCR 並配合快速核酸萃取方法與毛細管電泳分析，可於短時間內完成馬鈴薯轉殖品項檢測流程並得到準確的結果，期望可應用於不同基改馬鈴薯轉殖品項檢驗方法開發，供其他基改轉殖作物檢測流程之參考。

誌謝

本試驗感謝中央研究院余淑美院士提供基改馬鈴薯 2-1 轉殖品項材料，並感謝台南區農業改良場楊藹華研究員、農業試驗所種原組陳述副研究員、種苗改良繁殖場陳哲仁助理研究員、桃園區農業改良場沈雅鈞助理研究員參加能力試驗。

引用文獻

Ahn, J. H., J. H. Kim, S. Y. Kim, W. Y. Lee, S. H. Park, and H. Y. Kim. 2008. Multiplex PCR detection for 3 events of genetically modified maize, DAS-59122-7, TC6275, and MIR604. Food Sci. Biotechnol. 17:569–572.

Basak, S., N. Z. Ehtesham, B. Sesikeran, and S. Ghosh. 2014. Detection and identification of transgenic elements by fluorescent-PCR-based capillary gel electrophoresis in genetically modified cotton and soybean. J. AOAC Int. 97:159–165.

Borovkov, A. Y., P. E. McClean, and G. A. Secor. 1997. Organization and transcription of the gene encoding potato UDP-glucose pyrophosphorylase. Gene 186:293–297.

Carter, C. A. and G. P. Gruère. 2006. International approval and labeling regulations of genetically modified food in major trading countries. p.459–480. *in*: Regulating Agricultural Biotechnology: Economics and Policy. (Just. R. E., J. M. Alston, and D. Zilberman, eds.) Natural Resource Management and Policy. Vol. 30. Springer, Boston, MA. 577 pp.

Dunmore, C. 2013. EU court annuls approval of BASF's Amflora GMO potato. Reutters, London, UK. https://www.reuters.com/article/eu-gmo-potato/eu-court-annuls-approval-of-basfs-amflora- gmo-potato-idUSL6N0JS1TH20131213 (visit on 6/19/2017)

European Commission. 2003. Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. EUR-Lex, Luxembourg, Germany. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32003R1830 (visit on 6/19/2017)

European Commission. 2010a. Commission Decision of 2 March 2010: Authorising the placing on the market of feed produced from the genetically modified potato EH92-527-1 (BPS-25271-9) and the adventitious or technically unavoidable presence of the potato in food and other feed products under Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council. EUR-Lex, Luxembourg, Germany. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1546478897240&uri=CELEX-:32010D0136 (visit on 3/30/2017)

European Commission. 2010b. Commission Decision of 2 March 2010: Concerning the placing on the market, in accordance with Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council, of a potato product (*Solanum tuberosum* L. line EH92-527-1) genetically modified for enhanced content of the amylopectin component of starch. EUR-Lex, Luxembourg, Germany. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010D0135 (visit on 7/18/2017)

Fraiture, M. A, P. Herman, I. Taverniers, M. De Loose, D. Deforce, and N. H. Roosens. 2015. Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions. Biomed Res. Intl. 2015:392872.

Geiger, M., C. Biesgen, and P. Hofvander. 2012. Amylopectin type starch with enhanced retrogradation stability. BASF Plant Science Company GmbH, Limburgerhof, Germany. https://patents.google.com/patent/US20120216316 (visit on 8/3/2016)

Heide B. R., E. Heir, and A. Holck. 2008. Detection of eight GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. Eur. Food Res. Technol. 227:527–535.

Henegariu O., N. A. Heerema, S. R. Dlouhy, G. H. Vance, and P. H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. BioTechniques 23:504–511.

Hofvander, P. 2005. Structure and DNA sequence of insert and flanking genomic region of potato event EH92-527-1. BASF Plant Science Company GmbH, Limburgerhof, Germany. https://www.saveourseeds.org/fileadmin/files/SOS/Dossiers/Mon_863/Amended_Report_BPS-003A-05.pdf (visit on 3/23/2016)

Hong, Y. F., C. Y. Liu, K. J. Cheng, A. L. Hour, M. T. Chan, T. H. Tseng, K. Y. Chen, J. F. Shaw, and S. M. Yu. 2008. The sweet potato sporamin promoter confers high-level phytase expression and improves organic phosphorus acquisition and tuber yield of transgenic potato. Plant Mol. Biol. 67:347–361.

Hosaka, K. 2004. An easy, rapid, and inexpensive DNA extraction method, "one-minute DNA extraction," for PCR in potato. Amer. J. Potato Res. 81:17–19.

International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. The International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Ithaca, NY. 125 pp.

Kim, J. H., S. A. Kim, Y. J. Seo, W. Y. Lee, S. H. Park, and H. Y. Kim. 2008. Multiplex PCR detection of the MON1445, MON15985, MON88913, and LL-cotton25 varieties of GM cotton. Food Sci. Biotechnol. 17:829–832.

Kim, J. H., Y. J. Seo, S. H. Sun, and H.Y. Kim. 2009. Multiplex PCR detection of 4 events of genetically modified soybeans (RRS, A2704-12, DP356043-5, and MON89788). Food Sci. Biotechnol. 18:694–699.

Lipp, M., A. Bluth, F. Eyquem, L. Kruse, H. Schimmel, G. van den Eede, and E. Anklam. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. Eur. Food Res. Technol. 212:497–504.

Rostamkhani, N., A. Haghnazari, M. Tohidfar, and A. Moradi. 2011. Rapid identification of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants by loop-mediated isothermal amplification. Czech J. Genet. Plant Breed. 47:140–148.

Taiwan Food and Drug Administration. 2018. The list of genetically modified food ingredients (in review). Taiwan Food and Drug Administration, Taipei, Tai-

wan. https://www.fda.gov.tw/TC/site.aspx?sid=1510 (in Chinese) (visit on 8/13/2018)

Watanabe, T., H. Kuribara, T. Mishima, H. Kikuchi, T. Kodama, S. Futo, K. Kasama, A. Toyota, M. Nouno, A. Saita, K. Takahashi, A. Hino, H. Akiyama, T. Maitani, and M. Kubo. 2004. New qualitative detection methods of genetically modified potatoes. Biol. Pharm. Bull. 27:1333–1339.

Establishment and Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of Transgenic Potatoes

Yuan-Kai Tu[1], Yu-Wei Feng[2], Lit-Fu Chan[3], Shu Chen[4], Yen-Chun Lin[5], and Han-Wei Chen[1,*]

Abstract

Tu, Y. K., Y. W. Feng, L. F. Chan, S. Chen, Y. C. Lin, and H. W. Chen. 2019. Establishment and application of multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of transgenic potatoes. J. Taiwan Agric. Res. 68(1):16–27.

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is known as one of the most important food crops in the world and has high application in industry and feed. In this study, we present a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) method for simultaneous detection of genetically modified (GM) potatoes. Quadruplex PCR assay targeting three event-specific sequences and the taxon-specific endogenous reference gene (UDP-glucose pyrophosphorylase; UGPase) were established. All potato DNA samples generated the expected PCR products, and the detection method performed robustly and specifically with various combinations of mixed GM potato events. The limit of detection (LOD) of each single GM sample in our mPCR detection assay was 0.5%. Furthermore, a proficiency test returned from four research sectors also indicated that our detection method had good reproducibility and repeatability. We also developed a simple, rapid and cost-efficient nucleic acid extraction method coupled with multiplex PCR and followed capillary electrophoresis. These results suggest that our methods are suitable for detecting multiplex PCR targets and have the potential for screening unknown genetically modified potato samples through a simple procedure.

Key words: Potato, mPCR, Detecting method.

Received: May 23, 2018; Accepted: August 27, 2018.

* Corresponding author, e-mail: swaychen@tari.gov.tw

1 Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

2 Technical Specialist, Dawu Township Office, Taitung Country, Taiwan, ROC.

3 Associate Research Fellow, Technical Service Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

4 Associate Research Fellow, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

5 Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(1):28–39 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201903_68(1).0003

研究報告

甘藷儲藏性病害及病因之研究

吳昭蓉[1] 楊宏仁[2] 林靜宜[1] 黃巧雯[3] 許淑麗[4] 賴素玉[4] 倪蕙芳[5,*]

摘要

吳昭蓉、楊宏仁、林靜宜、黃巧雯、許淑麗、賴素玉、倪蕙芳。2019。甘藷儲藏性病害及病因之研究。台灣農業研究 68(1):28–39。

甘藷儲藏病害為儲藏過程中造成損失的重要因子之一。為瞭解甘藷儲藏性病害發生情形，本研究由彰化大城及雲林水林兩地區採收甘藷中，挑選外觀健康之塊根，於 15℃恆溫室中儲放 12 wk。儲藏期間每 2 wk 調查病害發生情形，並將罹病塊根進行組織分離。彰化大城之甘藷於 12 wk 時，504 條塊根裡有 436 條發生腐敗情形，雲林水林則是在 500 條塊根中有 233 條發生腐敗情形。分離出主要的真菌種類有 6 類，包括 *Diaporthe batatas*、*Fusarium* spp.、*Lasiodiplodia theobromae*、*Macrophomina phaseolina*、*Phomopsis destruens* 及其他 *Phomopsis* spp.。上述分離之真菌經柯霍式法則驗證，發現 *D. batatas*、*L. theobromae*、*M. phaseolina*、*P. destruens* 及其他 *Phomopsis* spp. 均可造成塊根腐敗，確為甘藷塊根儲藏病原，*Fusarium* spp. 則在塊根上未造成任何病徵。本研究之結果，可作為後續篩選甘藷儲藏性病害田間防治藥劑時重要之參考。

關鍵詞：甘藷、儲藏性病害、乾腐病、黑腐病、炭腐病。

前言

甘藷，學名 *Ipomoea batatas* (L.) Lam.，俗稱番薯、地瓜等，屬於旋花科 (Convolvulaceae) 甘藷屬 (*Ipomoea*) 植物，原產於南美洲，先傳播於大洋洲及紐西蘭，而後傳入熱帶亞洲及非洲。至 2011 年起，甘藷全球產量僅次於稻米、小麥、玉米、馬鈴薯，為世界第五大重要之糧食作物 (Regional Office for Asia and the Pacific, Food and Agriculture Organization of the United Nations 2014)。在台灣，氣候環境適合甘藷栽培，根據 2016 年農委會農業統計年報 (http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx) 顯示，我國甘藷栽培面積為 10,589 ha，年產量 242,030 Mg，以雲林、彰化、台南為主要產區。常見品種有塊根用之「台農 57 號」及「台農 66 號」，葉菜用品種則有「台農 71 號」及「桃園 2 號」。

已知甘藷採收時，如果於表面產生傷口，適當的濕度加上微生物入侵，易造成塊根腐敗 (Clark 1992)。因此，採後儲藏病害造成之損失，為甘藷儲藏的重要限制因子之一 (Ray & Ravi 2005)。由真菌造成甘藷採後儲藏性病害，主要有 *Lasiodiplodia theobromae* 引起之甘藷黑腐病 (Java black rot)，由 *Rhizopus stolonifer* 引起之軟腐病 (soft rot)，由鐮孢菌屬 (*Fusarium* spp.) 造成之根腐病，由 *Ceratocystis fimbriata* 引起之黑斑病 (black rot) 等，較次要者則有由 *Macrophomina phaseolina* 引起之炭腐病 (charcoal rot)，由 *Phomopsis destruens* 引起之基腐病 (foot rot)，由 *Diaporthe batatas* 引起之乾腐病 (dry rot) 及由 *Aspergil-*

投稿日期：2018 年 4 月 24 日；接受日期：2018 年 8 月 28 日。
* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系研究助理。台灣 嘉義市。
[5] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

lus ochraceus、*Cochliobolus lunatus* 及 *Gliomastrix novae-zelandiae* 等引起之塊根腐敗。其中，*L. theobromae*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* 及 *P. destruens* 除了使塊根腐敗外，也會在植株上造成病徵 (Harter *et al*. 1918; Ray & Nedunchezhiyan 2012; Clark *et al*. 2013; Huang *et al*. 2016)。目前已記錄在台灣引起甘藷塊根病害者，有 *C. fimbriata*、*Fusarium* spp.、*L. theobromae*、*R. stolonifer* (Hsu *et al*. 2002)、*D. batatas* (Wang 2014) 及 *P. destruens* (Huang *et al*. 2012) 等，*M. phaseolina* 在台灣雖無對甘藷危害報導，但已知會造成甜瓜炭腐病 (Tsay & Tung 1996) 及萊豆灰莖枯病 (Lin *et al*. 1995)。

台灣過去雖陸續有甘藷塊根病害發生之報導，但並無針對甘藷採收後，在低溫儲藏時，進行病害發生情形及菌相之調查。本篇報告以彰化大城及雲林水林採收之甘藷塊根為研究標的，調查採後儲藏病害之菌相及其分離率、觀察分離真菌形態並探討其病原性，確認台灣甘藷塊根上常見的採後儲藏病害種類，可作為未來篩選田間防治藥劑時之參考。

材料與方法

儲藏甘藷病害調查

採集 2015 年彰化大城地區及 2016 年雲林水林地區各 10 田區甘藷塊根，採收後置於通風陰涼處 1 wk 癒傷後，每一田區挑選約 50 條外觀完整無病斑之塊根，裝在塑膠籃中。儲藏於 15℃走入式定溫室，2 wk 調查一次，檢視塊根腐敗發生情形，調查持續至儲藏後第 12 週為止。

罹病甘藷塊根菌相分離與真菌保存及形態觀察

於每 2 wk 調查過程中，如發現新出現腐敗病徵之塊根，則以自來水洗淨風乾後，剖開甘藷塊根。經以 75% 酒精表面消毒後，用滅菌解剖刀切取塊根剖面病健部，置於 pH 值 3.8 之 Potato Dextrose Agar (PDA) 培養基 [即 acidified PDA (APDA)，係高溫滅菌後之 300 mL PDA 培養基，降溫後加入 750 µL 50% (v/v) 乳酸溶液 (lactic acid)] 平板上。待分離之病組織長出菌絲或產孢後，切取單菌絲或挑單孢，移到 PDA 上培養。將分離的真菌，移至 2% 水瓊脂 (water agar; WA) 培養基上培養，並將菌絲塊切成約 0.5 cm × 0.5 cm 方塊，置入裝無菌水之保存管中，於室溫及 10℃冰箱中保存待用。此外，為促進菌株產孢，將木麻黃葉或甘藷莖節切成約 3 cm 小段，滅菌後放置於 2% 水瓊脂培養基上並移置菌絲塊於其上。待真菌於木麻黃葉或甘藷莖節上產孢時，挑取分生孢子置於載玻片上，並以干涉位相差顯微鏡 (differential interference contrast; DIC, Nikon 80i, Nikon, Tokyo, Japan) 觀察孢子形態，並以 NIS-Elements BR 3.0 軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 隨機挑選 50 個分生孢子，測量其長度及寬度。

病原菌分子鑑定

將菌株培養於 PDA 培養基上，待菌絲長出後，刮取菌絲置於 1.5 mL 微量離心管中。加入 0.5 N NaOH 溶液，以均質機將菌絲磨碎後，離心並吸取上清液。繼而加入 9× 體積之 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)，進行混合後作為 PCR 反應之核酸模板 (Tsai 2005)。以 Taq DNA Poly (Protech) 聚合酶酵素進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應，增幅 internal transcribed spacer (ITS) 片段時所使用之引子對為 ITS1 及 ITS4 (White *et al*. 1990)。增幅後產物，委由源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., New Taipei, Taiwan) 進行定序，定序結果在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資料庫中進行序列比對。

接種源的配製及病原性測定

接種時使用之菌株，包括 *D. batatas* Ph-832 菌株、*L. theobromae* B2715 菌株、*M. phaseolina* Mp-001 菌株、*P. destruens* SPPD-50 菌株及其他 *Phomopsis* spp. Ph-835 菌株，皆由儲藏後腐敗甘藷塊根上分離獲得。待測菌株於 PDA 上以無光照方式培養，除 *P. destruens* 以 20℃培養外，其他病原菌以 25℃培養。待菌落直徑達 4–6 cm 時，以滅菌之打孔器 (孔徑 0.5 cm) 切

取菌落邊緣之菌絲塊圓片備用，接種用之塊根先以清水洗淨，再以 75% 酒精消毒後風乾。接種方式分為打孔接種及削皮接種，打孔接種為以滅菌消毒之直徑 0.5 cm 打洞器於塊根製造深 1 cm，直徑 0.5 cm 之圓柱形孔洞，再將待測菌株之菌絲圓片放入孔洞 (Khatoon *et al*. 2017)；削皮接種，則是以滅菌之解剖刀在塊根表面薄薄削開一層約 1 cm × 1 cm 之表皮，表皮仍留一邊與塊根相連，輕輕把表皮挑開後，將菌絲塊圓片菌絲面朝下放入夾層，再將表皮覆蓋回去。另外，以不含菌絲之 PDA agar 圓塊置於打孔或削皮之藷塊傷口，作為對照。接種後塊根置於密封盒保濕，置於 25℃ 下觀察，直到病徵出現為止。切取病健部進行組織分離，確認分離真菌種類與原接種菌株相同。

結果

甘藷儲藏後腐敗發生率及分離菌相之調查

調查 2015 年彰化大城地區「台農 66 號」甘藷及 2016 年雲林水林地區「台農 57 號」甘藷，其腐敗的發生率 (incidence)、分離菌相及不同週數分離到該菌之塊根數如表 1 所示。2015 年彰化大城地區之甘藷，隨著儲藏時間之增加，其腐敗發生率明顯增加。至 12 wk 時，504 條塊根中有 436 條腐敗，其中由腐敗塊根所分離之真菌以 *L. theobromae* 最多；6 wk 時共有 145 條塊根分離到該菌，且儲藏後 4–8 wk 為其高峰。次者為 *Fusarium* spp.，其高峰發生在 6–8 wk。其他則包含 *D. batatas*、*P. destruens*、*M. phaseolina* 及其他 *Phomopsis* spp. 等，其高峰多發生在儲藏 6 wk 時。2016

表 1.　2015 年彰化大城及 2016 年雲林水林甘藷於儲藏期間腐敗發生率、甘藷分離真菌種類及不同週數分離之甘藷條數。

Table 1.　The incidence, fungal species and quantity of rotten roots in different periods of storage from Dacheng, Changhua in 2015 and Shueilin, Yunlin in 2016.

			Numbers of rotten roots						
Year	Location	Species	2 wk	4 wk	6 wk	8 wk	10 wk	12 wk	total
2015	Dacheng, Changhua	*Diaporthe batatas*	0	2	13	7	0	0	22
		Fusarium spp.	0	1	29	33	15	0	78
		Lasiodiplodia theobromae	1	55	145	64	18	1	284
		Macrophomina phaseolina	0	0	3	0	3	0	6
		Phomopsis spp.	0	1	12	3	3	0	19
		Phomopsis destruens	1	2	2	0	0	0	5
		Others	0	1	1	0	2	1	5
		No fungi isolated	3	7	4	0	1	2	17
		Incidence[z]	5/504	74/504	283/504	390/504	432/504	436/504	–
2016	Shueilin, Yunlin	*Diaporthe batatas*	0	0	15	8	10	1	34
		Fusarium spp.	0	0	4	26	47	23	100
		Lasiodiplodia theobromae	0	1	6	4	0	1	12
		Macrophomina phaseolina	0	0	2	1	0	2	5
		Phomopsis spp.	3	0	2	9	5	2	21
		Others	0	0	2	6	4	6	18
		No fungi isolated	0	2	4	11	7	9	33
		Incidence[z]	3/500	6/500	41/500	106/500	179/500	223/500	–

[z] Incidence: accumulative numbers of rotten roots/total roots investigated.

年雲林水林地區收集之甘藷，至 12 wk 時，500 條調查塊根中有 223 條腐敗，分離到最多的真菌為 *Fusarium* spp.，其高峰集中在 8–10 wk 間，最多則在儲藏 10 wk 時，共分離到 47 株。次者為 *D. batatas*，在 6 wk 時分離到 15 株。其他包含 *L. theobromae*、*M. phaseolina* 及其他 *Phomopsis* spp.，分離到真菌塊根數最多的時期集中於儲藏後 6–8 wk 間。腐敗之塊根，無論是「台農 57 號」或「台農 66 號」，多數由塊根一端或兩端開始產生壞疽，且無法僅由病徵判斷造成腐敗的真菌種類 (圖 1)。

病原菌之形態與分子鑑定

由腐敗塊根所分離的真菌根據外表形態之差異性，挑選了 Ph-832、Fu239、B2715、Mp-001、SPPD-50 及 Ph-835 菌株進行觀察及鑑定。Ph-832 於 PDA 培養基上呈現白色平舖狀菌落 (圖 2A)，其上散生黑色顆粒狀柄子器 (pycnidia)，在人工培養基上產生分生孢子 (圖 2B)，短紡錘形，無色，單胞，常具有 2 油

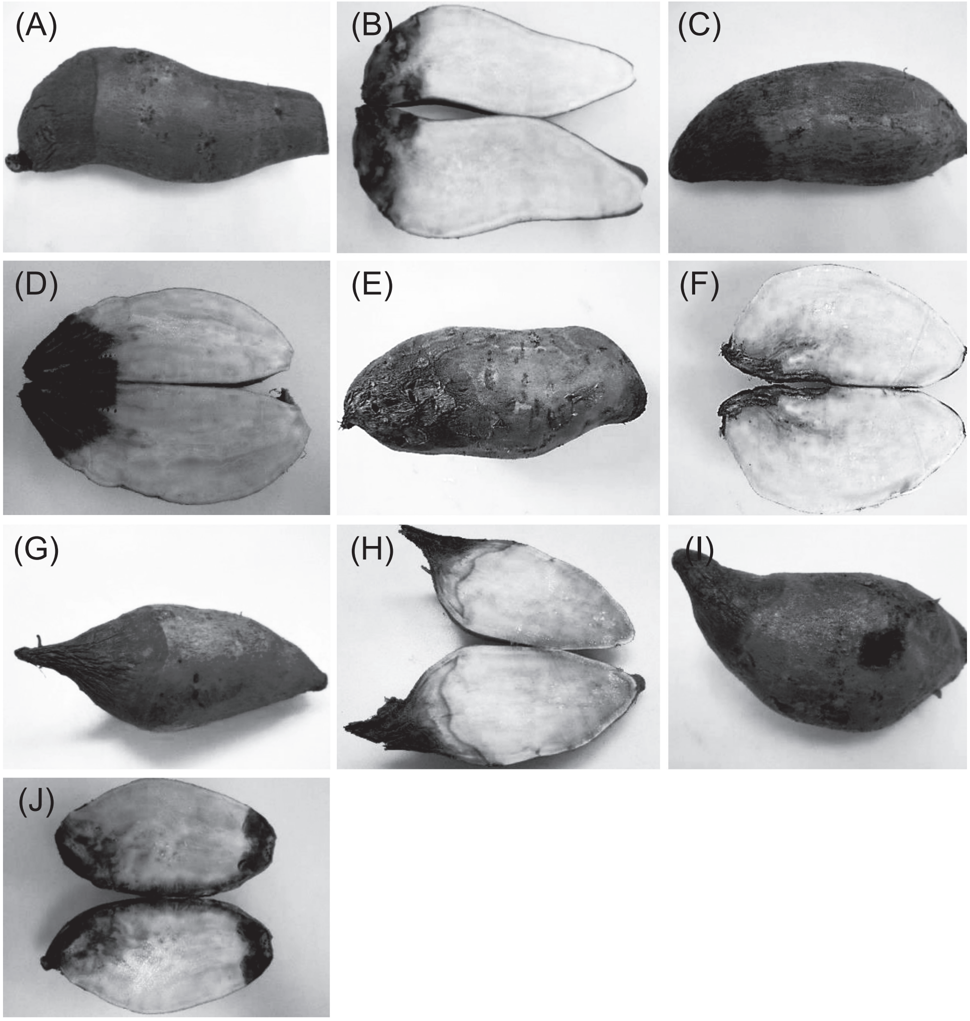

圖 1. 分離到 *Diaporthe batatas* (A、B)、*Fusarium* spp. (C、D)、*Lasiodiplodia theobroame* (E、F)、*Macrophomina phaseolina* (G、H) 及其他 *Phomopsis* spp. (I、J) 之「台農 57 號」儲藏期腐敗甘藷塊根外觀。

Fig. 1. The appearance of rotten sweet potatoes 'TN-57' that *Diaporthe batatas* (A, B), *Fusarium* spp. (C, D), *Lasiodiplodia theobroame* (E, F), *Macrophomina phaseolina* (G, H) or other *Phomopsis* spp. (I, J) were isolated.

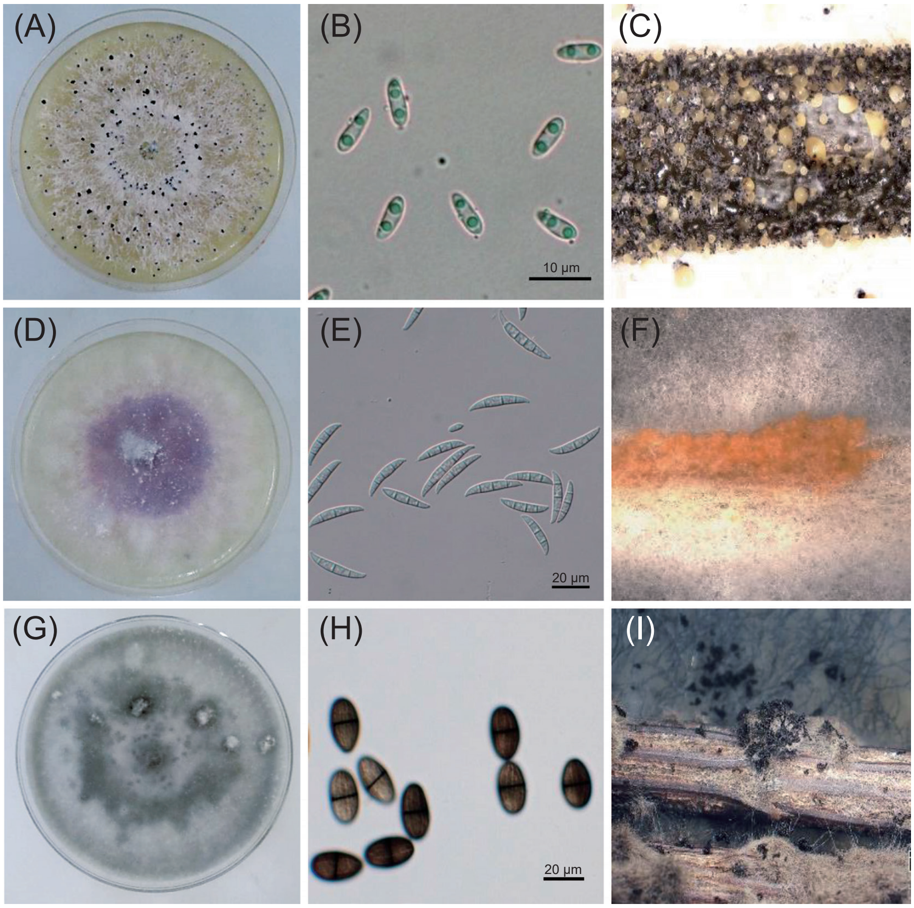

圖 2. *Diaporthe batatas* Ph-832 菌株在 Potato Dextrose Agar (PDA) 培養基之菌落 (A)、孢子 (B)、甘藷莖節上之產孢構造 (C)；*Fusarium* spp. Fu239 菌株在 PDA 培養基之菌落 (D)、孢子 (E)、木麻黃葉上之產孢構造 (F)；*Lasiodiplodia theobromae* B2715 菌株在 PDA 培養基之菌落 (G)、孢子 (H)、木麻黃葉上之產孢構造 (I)。

Fig. 2. The colony on Potato Dextrose Agar (PDA) (A), conidia (B) and sporulation on stem of sweet potato (C) of *Diaporthe batatas* strain Ph-832. The colony on PDA (D), conidia (E) and sporulation on *Casuarina equisetifolia* (F) of *Fusarium* spp. Fu239 strain. The colony on PDA (G), conidia (H) and sporulation on *Casuarina equisetifolia* (I) of *Lasiodiplodia theobromae* strain B2715.

滴，長 7.21 μm ± 0.07 μm，寬 2.53 μm ± 0.02 μm。在甘藷莖節上產生乳白色顆粒狀產孢構造 (圖 2C)，*D. batatas* Ph-832 菌株 ITS 序列 (accession No. MG827239) 經與 NCBI 資料庫比對，確認和 *D. batatas* 相似度最高 (accession No. KP995194)，根據形態及分子比對結果，鑑定為 *D. batatas*。Fu239 於 PDA 培養基上產生中央紫色之白色菌落 (圖 2D)，分生孢子鐮刀形 (圖 2E)，兩端尖細，多隔，長 32.6 μm ± 0.73 μm，寬 4.93 μm ± 0.06 μm，在木麻黃葉上形成橘色黏狀分生孢子堆 (圖 2F)。Fu239 菌株 ITS 序列 (accession No. MH747099) 經與 NCBI 資料庫比對，確認和 *Fusarium* sp. 相似度最高 (accession No. KF246479)。依據其菌落外觀、孢子形態及分子比對結果，鑑定為 *Fusarium* sp.。B2715 菌株於 PDA 培養基上產生白色毛狀菌落，菌落中央深灰色 (圖 2G)，分生孢子卵形近球狀 (圖 2H)，黑色，單隔，長 22.53 μm ± 0.26 μm， 寬 12.44 μm ± 0.16 μm，在木麻黃葉上形成黑色球狀柄子器 (圖 2I)。B2715 菌株 ITS 序列經與 NCBI 資料庫比對 (accession No. MH789983)，與 *L. theobro-*

mae 相似度最高 (accession No. MF580791)。依據菌落外觀、孢子形態及產孢構造等，鑑定為 *L. theobromae*。Mp-001 在 PDA 培養基形成深灰黑色平舖狀菌絲 (圖 3A)，分生孢子長卵形 (圖 3B)，單胞，無色，長 22.04 μm ± 0.25 μm，寬 9.98 μm ± 0.08 μm，在木麻黃葉上產生黑色顆粒狀柄子器 (圖 3C)。其 ITS 序列 (accession No. MG827241) 經與 NCBI 資料庫比對，和 *M. phaseolina* 相似度最高 (accession No. KJ780774)，依據其菌落外觀、孢子形態及分子比對結果，鑑定為 *M. phaseolina*。SPPD-50 在 PDA 培養基上產生淡桔色菌落，邊緣不整形 (圖 3D)，在人工培養基上產生分生孢子 (圖 3E)，圓筒狀或卵形，單胞，無色，兩端具圓形油滴，長 7.67 μm ± 0.12 μm，寬 3.82 μm ± 0.04 μm，在木麻黃葉上產生乳白色球狀產孢構造 (圖 3F)。SPPD-50 菌株 ITS 序列經與 NCBI 資料庫比對，與 *P. destruens* 序列 (accession No. JX421687) 相似度為百分之百，依據其菌落外觀及孢子形態，鑑定為 *P.*

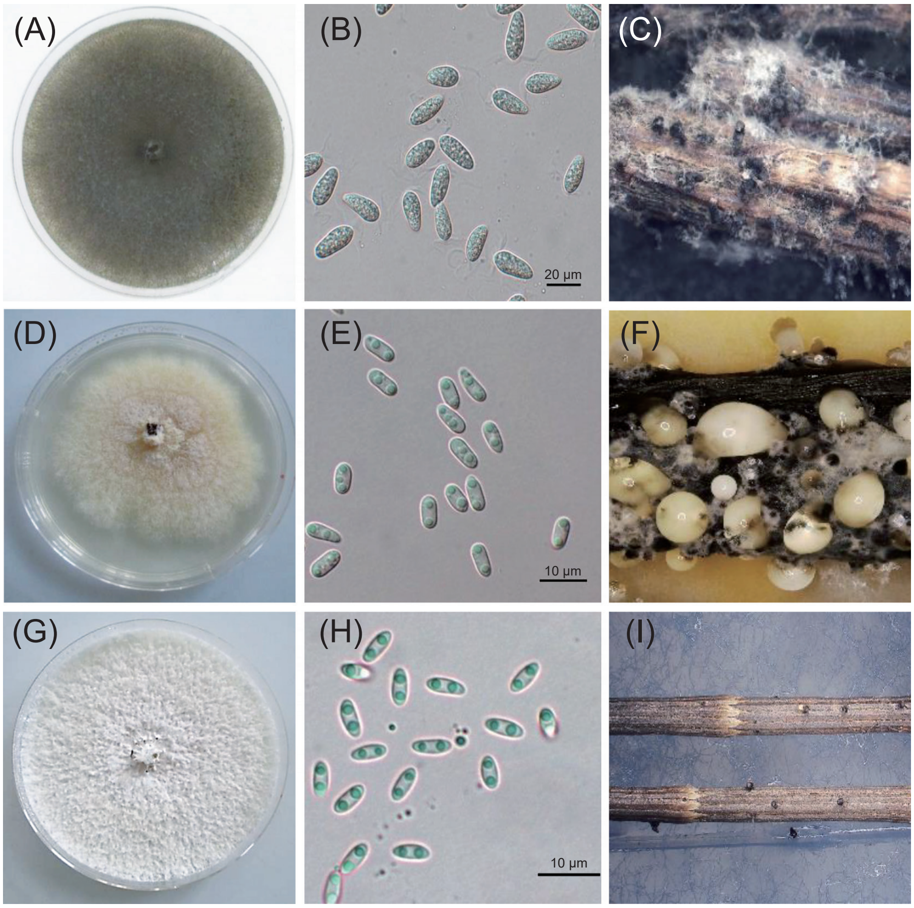

圖 3. *Macrohomina phaseolina* Mp-001 菌株在 Potato Dextrose Agar (PDA) 培養基之菌落 (A)、孢子 (B)、木麻黃葉上之產孢構造 (C)；*Phomopsis destruens* SPPD-50 菌株在 PDA 培養基之菌落 (D)、孢子 (E)、甘藷莖節上之產孢構造 (F)；其他 *Phomopsis* spp. Ph-835 菌株在 PDA 培養基之菌落 (G)、孢子 (H)、木麻黃葉上之產孢構造 (I)。

Fig. 3. The colony on Potato Dextrose Agar (PDA) (A), conidia (B) and sporulation on *Casuarina equisetifolia* (C) of *Macrophomina phaseolina* strain Mp-001. The colony on PDA (D), conidia (E) and sporulation on stem of sweet potato (F) of *Phomopsis destruens* strain SPPD-50. The colony on PDA (G), conidia (H) and sporulation on *Casuarina equisetifolia* (I) of other *Phomopsis* sp. strain Ph-835.

destruens。Ph-835 在 PDA 培養基上產生具濃密白色菌絲的菌落 (圖 3G)，分生孢子為短紡錘形 (圖 3H)，單胞，無色，兩端具圓形油滴，長 5.93 μm ± 0.06 μm，寬 2.49 μm ± 0.03 μm，在甘藷莖節上產生乳白色圓形產孢構造 (圖 3I)。依據菌落外觀、孢子形態、產孢構造以及菌株 ITS 序列 (accession No. MH746018) 分子比對結果，初步鑑定為 *Phomopsis* sp.。另外，由分離菌株中隨機挑選 3 株進行 ITS 序列分析 (Ph-845、Ph-846、Ph-855)，其序列與 Ph-835 相似度皆為百分之百。

病原性測定

以 *D. batatas* Ph-832 菌株在甘藷塊根上進行打洞接種，21 d 後，傷口周圍組織變軟。由外觀看，病斑與健部分界雖不明顯 (圖 4A)，但剖開塊根，內部組織呈現水浸狀並變軟，藷肉褐化現象不明顯 (圖 4B)。由塊根內部病健部處進行組織分離，可再次分離出 *D. batatas*，若以削皮接種，則塊根不發病。*L. theobromae* B2715 菌株以削皮方式接種，發病速度快，接種後 3 d 塊根表面已開始產生病

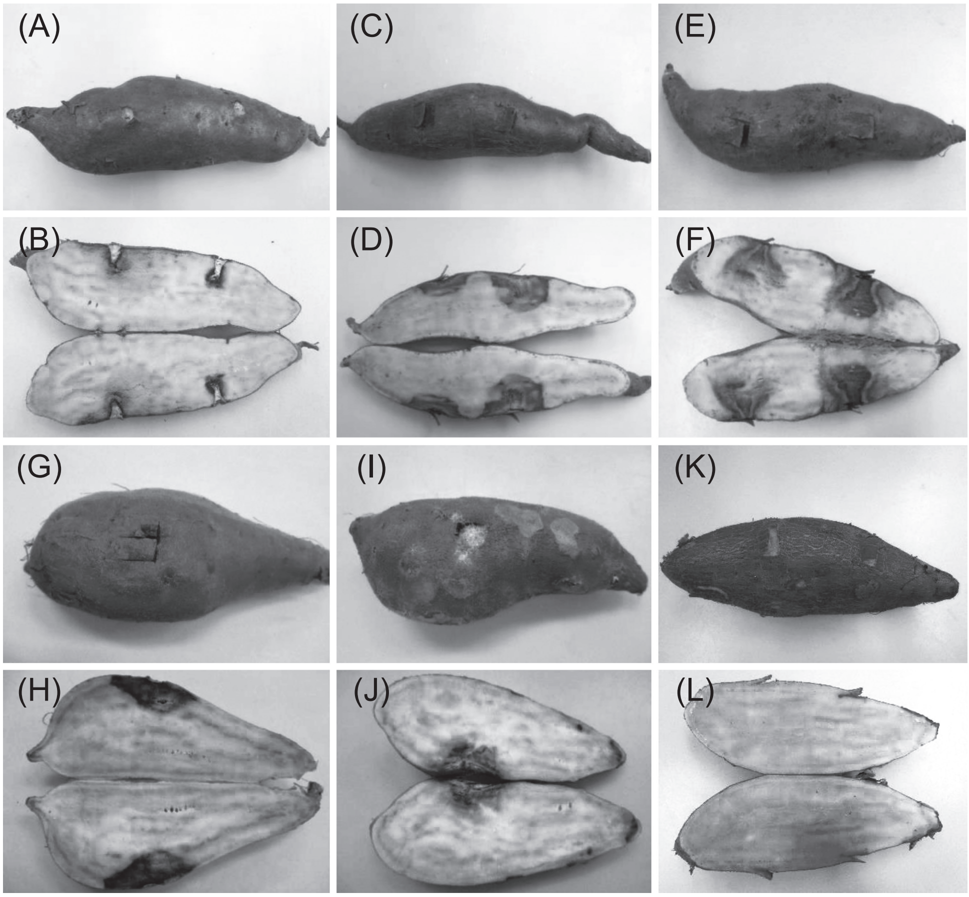

圖 4. *Diaporthe batatas* 菌株 Ph-832 以打孔接種於「台農 57 號」甘藷 (A、B)；*Lasiodiplodia theobromae* 菌株 B2715 (C、D)、*Macrophomina phaseolina* 菌株 Mp-001 (E、F)、*Phomopsis destruens* 菌株 SPPD-50 (G、H)、其他 *Phomopsis* sp. 菌株 Ph-835 (I、J) 以削皮接種於「台農 57 號」甘藷以及對照組 (K、L)。

Fig. 4. The symptoms on sweet potato 'TN57' after *Diaporthe batatas* strain Ph-832 (A, B) drilling-hole inoculation. The symptoms on sweet potato 'TN57' after *Lasiodiplodia theobromae* strain B2715 (C, D), *Macrophomina phaseolina* strain Mp-001 (E, F), *Phomopsis destruens* strain SPPD-50 (G, H) and *Phomopsis* sp. strain Ph-835 (I, J) inoculation by way of peeling. Inoculation with agar as control (K, L).

斑 (圖 4C)，並有軟化現象；5 d 時剖開塊根，內部組織大部分已褐化變軟，藷肉內部褐化部分與健部分界明顯 (圖 4D)。*M. phaseolina* Mp-001 菌株以削皮方式接種，塊根於接種處產生病斑 (圖 4E)，剖開可見內部由接種處開始產生炭黑色病組織，稍外圍之組織有紅棕色褐化情況，與健部分界不明顯 (圖 4F)。由塊根內部病健部處進行組織分離，可再次分離出 *M. phaseolina*。*P. destruens* SPPD-50 菌株以削皮方式接種，塊根表面產生病斑 (圖 4G)，切開塊根，內部組織褐化腐爛鬆軟 (圖 4H)，並散發臭味。*Phomopsis* sp. Ph-835 菌株以削皮方式接種，表面產生淺褐色塊斑 (圖 4I)，切開塊根，內部褐化，組織鬆軟 (圖 4J)。另外，針對 *Fusarium* spp. 數個菌株進行接種，皆未成功在塊根上產生腐敗病徵。另對照組之藷塊，無論以打孔接種或削皮接種，均不發病。

討論

本篇為台灣首篇探討甘藷於 15℃低溫儲藏條件下，甘藷塊根腐敗發生情形及其可能致病因子之報告。甘藷為我國重要的糧食作物之一，然而因為產量大多集中於 1、2 月，為能延長市場供應時間，因此利用低溫儲藏，以抑制塊根發芽及鮮重減少，但仍無法避免儲藏性病害之發生。甘藷儲藏之適溫約為 12–16℃ (Owunmen 1978; Kader 1985; Picha 1986; Li 2013)，本篇報告以 15℃作為儲藏溫度，可有效抑制「台農 57 號」及「台農 66 號」甘藷塊根發芽，同時不至於造成寒害。然而，國內外研究指出，此儲藏條件下，如無良好癒傷處理，塊根仍可能因病害損失 10–65% 產量 (Ray & Balagopalan 1997; Li 2015)。本研究持續調查儲藏 12 wk 期間甘藷塊根的腐敗發生情形，結果顯示彰化大城及雲林水林塊根經 12 wk 儲藏後，至少都有 40% 以上的腐敗發生率，且腐敗情形約於儲藏後 6–8 wk 開始大量發生。由此可知，低溫雖能抑制塊根發芽，但不足以完全遏止甘藷在儲藏期的損失，還需配合田間病害有效防治，及避免儲運時感染，以雙管齊下之方式，才能有效降低甘藷塊根在儲藏期的減損。

本研究將主要分離到的真菌歸為 6 類，其中基腐病之病原 *P. destruens* 與其他 *Phomopsis* spp. 為同一屬，同時 *D. batatas* 的無性世代亦屬於 *Phomopsis* spp.。從菌落形態上看，*P. destruens* 在 PDA 培養基上產生產生淡桔色菌落，邊緣不整形，相對於其他 *Phomopsis* spp. 在 PDA 培養基上產生白色平舖緻密菌絲層有明顯區隔，與 *D. batatas* 在 PDA 培養基上形成菌絲較稀疏的白色菌落及著生黑色顆粒狀柄子器也不同；此外，*D. batatas* 及 *P. destruens* 在酸化之 APDA 培養基上生長緩慢，*Phomopsis* spp. 菌絲可在 7 d 之內長滿直徑 6 cm 之 PDA 培養基。另外，經由接種試驗，受 *P. destruens* 侵染之塊根有明顯臭味，*D. batatas* 與其他 *Phomopsis* sp. 接種則無此情形。*Phomopsis* spp. 種之鑑定依據包含孢子形態、分子比對，以及利用病原性或毒性以區別，但其分生孢子形態及大小範圍相近，往往不足以區隔種 (van der Aa *et al*. 1990; Rehner & Uecker 1994)。若僅以 ITS 片段進行分子比對，則容易因序列相似度過高而發生誤判。除形態及分子鑑定外，亦可利用病原寄主範圍及病原性進行區別，但病原菌對寄主的病原性強弱差異是相對的，而非絕對的有或無 (Schilder *et al*. 2005)，容易產生判斷上的困難。綜合以上因素，使 *Phomopsis* spp. 之鑑定相形困難，無法順利鑑定到種名。

在儲藏病害造成之病徵方面，本研究結果顯示，儲藏期腐敗之甘藷，大多呈現一端或兩端褐化，而分離出不同真菌的塊根之間並無明顯差異，以致於無法僅由外觀判定儲藏病害之種類，與國外文獻描述病徵不盡相同。以 *D. batatas* 為例，其儲藏期之病徵會從甘藷一端開始褐化，與本篇報告相同，但除此之外，亦會伴隨出現塊根乾癟、皺縮，組織變硬及木乃伊化等病徵。*L. theobromae* 也會從一端褐化、變黑，但隨著病勢發展，塊根表面會產生黑色塊狀質地緊密的菌絲組織，亦為田間常見黑腐病的典型病徵；*M. phaseolina* 則先在甘藷皮層形成紅棕色壞疽，隨病勢發展及蔓延，壞疽中央變為炭黑色，而邊緣仍然呈現紅棕色；*P. destruens* 則會沿著莖基部蔓延到塊根，並

在儲藏期蔓延，造成褐色壞疽病徵 (Huang *et al*. 2012; Clark *et al*. 2013)。本研究在儲藏期觀察到的採後病害病徵與國外文獻 (Harter *et al*. 1918; Clark 1992; Clark *et al*. 2013) 相異，推測可能的原因，或許與甘藷品種、菌株特性有關。而低溫儲藏條件亦可能影響其病勢發展，進而影響病徵表現，如 *L. theobromae* 可能因此未產生黑色緻密菌絲構造。此外，本研究的調查方法，是觀察到罹病塊根即挑出進行組織分離，而未放任其病勢持續發展成典型病徵，也是本研究未觀察到病藷表現出典型病徵的可能原因之一。另外，*M. phaseolina* 雖未在儲藏性病害的調查中觀察到典型病徵，然而接種實驗中，出現了中央炭黑，周圍紅棕色的病徵，則與國外文獻 (Ray & Nedunchezhiyan 2012) 描述相符。

本研究中，在儲藏期不同週數時，分離到的真菌菌相比例亦不相同。以彰化大城為例，分離到最多的是 *L. theobromae*，在 4–8 wk 時大量出現，而 *Fusarium* spp. 雖僅次於 *L. theobromae*，但大多在儲藏後期開始發生，以 8 wk 時分離最多。調查雲林水林儲藏甘藷，分離到最多的是 *Fusarium* spp.，也多集中在儲藏後期的 8–12 wk，而其他真菌，如 *D. batatas*，*L. theobromae* 及 *M. phaseolina* 則在儲藏前期相對有較多分離數。菌相於不同時期發生的原因，可能與塊根本身細胞及生理活性有關。一旦塊根的細胞及生理活性隨著儲藏期的延長而下降，則侵染的條件也將轉為對腐生性強的病原菌較有利。儲藏後期時，塊根的活性大幅下降，其腐敗可能為生理性，組織分離時無法分離到任何真菌，或者分離得到的真菌可能為腐生菌，而非病原菌。

為確認由塊根上分離之真菌具病原性，而非塊根腐敗後生長之腐生菌，進行接種試驗。結果 *D. batatas*、*L. theobromae*、*M. phseolina*、*P. destruens* 及部分 *Phomopsis* spp. 可造成塊根腐敗，具有病原性，與國外報導 (Ray & Balagopalan 1997; Khatoon *et al*. 2017) 造成甘藷儲藏性病害的病原一致。*Fusarium* spp. 則未能造成病徵，其原因可能為接種方式與條件不利於發病，也可能由腐敗塊根上分離的 *Fusarium* spp. 中，至少有一部分是不具病原性的腐生菌。*Fusarium* spp. 在自然界扮演多重角色，除為病原菌之外 (Ploetz & Palmateer 2007; Taylor *et al*. 2017) 之外，*Fusarium* spp. 亦可能為腐生菌甚至是內生真菌，相關研究同時指出這些腐生或內生菌可能具有防治病原菌的潛力 (Fracchia *et al*. 2000; Bacon *et al*. 2008; Barik *et al*. 2010)。

如欲以田間藥劑施用作為防治甘藷採後病害的方式，應考慮各個病原菌特性、在田間感染或傳播的情形，以及是否具潛伏性等因素，以掌握正確的施藥時間與時機。在田間感染的情況中，*P. destruens* 造成甘藷基腐病，除了塊根腐敗外，也會在田間使莖基部褐化乾枯，植株黃化枯萎 (Huang *et al*. 2012; Huang *et al*. 2016)。目前已知甘藷基腐病可藉由種植前淹水、去除田間病殘體、健康種苗及使用推薦藥劑腐絕及貝芬菲克利等進行田間防治，因此在發病田間尤應注意上述管理措施，發病田區所採收之甘藷盡量勿做儲藏，以避免後續儲藏性病害的發生。*L. theobromae* 除危害塊莖外，亦可造成甘藷莖部潰瘍 (Huang *et al*. 2017)。除此之外，*L. theobromae* 為多犯性真菌，造成其他根莖類作物，如芋頭、山藥、樹薯塊根或塊莖腐敗，其防治方法包括選用健康的塊根或塊莖作為種源，並在種植前進行適當的風乾或消毒，在排水良好的地上種植，以及輪作。另外，在山藥上亦有利用枯草桿菌或木黴菌進行防治的報導 (Reddy 2015)。*M. phaseolina* 寄主範圍廣，可在豆類、穀物、水果上造成病害 (Ndiaye 2007)，且可藉由土壤、種子傳播，感染後植物組織變黑，並產生小粒黑色菌核，而成為初次感染源。本病原防治方式，可藉由土壤消毒、清除田間殘體的方式來進行 (Tsay & Tung 1996)。在潛伏特性上，*L. theobromae* 在柑桔未成熟青果上潛伏感染，並於採收後儲藏期發病 (Adisa & Obinyereokwu 2004)；*Phomopsis* spp. 在葡萄果實上潛伏感染，且病原菌於開花期已存在於花器上 (Pscheidt & Pearson 1989)。可知在本研究中報導的病原菌種類，至少有 *L. theobromae* 和 *Phomopsis* spp. 兩種具潛伏感染特性。應從田間栽培時期以適當藥

劑進行防治，阻止病原菌入侵，並配合前述其他耕作防治方式，降低田間病原菌族群數量，減少病原菌於採收後由傷口入侵機率。

本篇報告在調查時，並未分離到 *R. stolonifer*，其已知為甘藷採後儲藏病害重要的病原菌 (Ray & Nedunchezhiyan 2012; Khatoon *et al*. 2017)。*R. stolonifer* 在甘藷上造成軟腐病，如塊根本身有傷口，將有助於侵染，且最適侵染溫度為 20℃ (Clark *et al*. 2013)，而 Scruggs & Quesada-Ocampo (2016) 指出當溫度及相對濕度較低時，例如在 13℃且相對濕度低於 90% 環境下，*R. stolonifer* 在塊根上的侵染明顯趨緩，且在 2–5℃時，其菌絲生長及孢子發芽幾乎完全停滯 (Amiri *et al*. 2011)。本篇報告一開始挑選外觀完整無病徵之健康塊根，且於低溫下儲藏，條件不利於 *R. stolonifer* 之侵染，可能為本研究中未分離到該病原菌之原因，或許亦暗示良好的低溫儲藏條件可有效防止軟腐病在採後儲藏期發生。

本篇報告調查台灣甘藷採後儲藏性病害之種類及發生情形，確認其病原性，研究結果可作為後續甘藷採收後病害防治時之依據。對於儲藏性病害防治之研究，除可針對前述病原菌進行化學藥劑防治外，亦可依病原菌特性，進行耕作防治，如淹水、清除田間殘體、輪作、土壤消毒、使用健康種藷等，或進行其他物理、生物防治之研究，以作為病害防治之參考。

誌謝

本研究承行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所農藝系賴永昌主任及黃哲倫助理研究員提供甘藷田及健康種苗，以及陳幸葵小姐、江瑞麟及蔡佳達先生協助試驗進行，特此誌謝。

引用文獻

Adisa, V. A. and O. A. Obinyereokwu. 2004. Studies on the latent infection of *Botryodiplodia theobromae* Pat. on *Citrus sinensis* (Li.) Osbeck fruit. Mycopathologia 102:165–167.

Amiri, A., W. Chai, and G. Schnabel. 2011. Effect of nutrient status, pH, temperature and water potential on germination and growth of *Rhizopus stolonifer* and *Gilbertella persicaria*. J. Plant Pathol. 93:603–612.

Bacon, C. W., A. E. Glenn, and I. E. Yates. 2008. *Fusarium verticillioides*: Managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. Toxin Rev. 27:411–446.

Barik, B. P., K. N. Tayung, P. N. Jagadev, and S. K. Dutta. 2010. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. Eur. J. Biol. Sci. 2:8–16.

Clark, C. A. 1992. Postharvest diseases of sweet potatoes and their control. Postharv. News Inf. 3:75–79.

Clark, C. A., D. M. Ferrin, T. P. Smith, and G. J. Holmes. 2013. Compendium of Sweet Potato Disease, Pests, and Disorders. 2nd ed. APS Press. St. Paul, MN. 160 pp.

Fracchia, S., I. Garcia-Romera, A. Godeas, and J. A. Ocampo. 2000. Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. Plant Soil 223:177–186.

Harter, L. L., J. L. Weimer, and J. M. R. Adams. 1918. Sweet-potato storage-rots. J. Agric. Res. 15:337–368.

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsai. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

Huang, C. W., M. F. Chuang, S. S. Tzean, H. R. Yang, and H. F. Ni. 2012. Occurrence of foot rot disease of sweet potato caused by *Phomopsis destruens* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 21:47–52. (in Chinese with English abstract)

Huang, L. F., B. P. Fang, K. M. Li, S. J. Ye, J. Y. Chen, Z. X. Luo, and Z. Y. Wang. 2016. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing a stem canker on sweet potato in China. Plant Dis. 100:1948.

Huang, C. W., H. R. Yang, C. Y. Lin, S. L. Hsu, W. C. Ko, and H. F. Ni. 2017. Screening of fungicides for foot rot of sweet potato caused by *Phomopsis destruens*. J. Taiwan Agric. Res. 66:66–73. (in Chinese with English abstract)

Kader, A. A. 1985. Postharvest Technology of Horticultural Crops. University of California. Davis, CA. 192 pp.

Khatoon, A., A. Mohapatra, and K. B. Satapathy. 2017. Studies on fungi associated with storage rot of Sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] root tubers in Odisha, India. Intl. J. Micro. Myco. 5(2):1–7.

Li, H. C. 2013. Storage temperature affects quality of fresh tuberous roots of sweet potato during storage

period. J. Taiwan Agric. Res. 62:174–183. (in Chinese with English abstract)

Li, H. C. 2015. Effect of curing and hot water treatment on the storage of sweet potato. Crop Environ. Bioinform. 12:95–104. (in Chinese with English abstract)

Lin, Y. S, T. C. Yang, and C. H. Kuo. 1995. Diseases of beans and green manure crops. p.186–198. *in*: Taiwan Agricultural Encyclopedia Vol. 2. 3rd ed. (Council of Agriculture, Executive Yuan, ed.) Feng Nien. Taipei, Taiwan. 4700 pp. (in Chinese)

Ndiaye, M. 2007. Ecology and Management of Charcoal Rot (*Macrophomina Phaseolina*) on Cowpea in the Sahel. Ph.D. Dissertation. University of Wageningen, Wageningen, The Netherlands. 114 pp.

Owunmen, I. C. 1978. The Tropical Tuber Crops: Yams, Cassava, Sweet potato, and Cocoyams. Wiley. New York. 234 pp.

Picha, D. H. 1986. Weight loss in sweet potatoes during curing and storage: Contribution of the transpiration and respiration. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111:889–892.

Ploetz, R. C. and A. J. Palmateer. 2007. First report of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on roselle in the United States. Plant Dis. 91:639.

Pscheidt, J. W. and R. C. Pearson. 1989. Time of infection and control of *Phomopsis* fruit rot of grape. Plant Dis. 73:829–833.

Ray, R. C. and C. Balagopalan. 1997. Postharvest Spoilage of Sweet Potato. Central Tuber Crops Research Institute. Kerala, India. 31 pp.

Ray, R. C. and V. Ravi. 2005. Spoilage of sweet potato in tropics and control measures. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45:623–644.

Ray, R. C. and M. Nedunchezhiyan. 2012. Postharvest fungal rots of sweet potato in tropics and control measures. Fruit, Veg. Cereal Sci. Biotech. 6:134–138.

Reddy, P. P. 2015. Plant Protection in Tropical Root and Tuber Crops. Springer India. New Delhi, India. 336 pp.

Regional Office for Asia and the Pacific, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. FAO Statistical Yearbook 2014: Asia and the Pacific Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 195 pp.

Rehner, S. A. and F. A. Uecker. 1994. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. Can. J. Bot. 72:1666–1674.

Schilder, A. M. C., O. Erincik, L. Castlebury, A. Rossman, and M. A. Ellis. 2005. Characterization of *Phomopsis* spp. infecting grapevines in the Great Lakes region of North America. Plant Dis. 89:755–762.

Scruggs, A. C. and L. M. Quesada-Ocampo. 2016. Cultural, chemical, and alternative control strategies for Rhizopus soft rot of sweet potato. Plant Dis. 100:1532–1540.

Taylor, A., I. L. Sims, A. C. Jackson, and J. P. Clarkson. 2017. First report of *Fusarium oxysporum* causing a vascular wilt of statice (*Limonium sinuatum*) in the U.K. Plant Dis. 101:1040.

Tsai, H. L. 2005. Development of Techniques for Detection of Latent Infection and Molecular Identification of Mango Anthracnose Fungi. Master Thesis, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 92 pp. (in Chinese with English abstract)

Tsay, J. G. and B. K. Tung. 1996. Charcol rot (*Macrophomina phaseolina*) and botryodiplodia decline (*Botryodiplodia theobromae*) of melons in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 5:199. (Chinese abstract)

van der Aa, H. A., M. E. Noordeloos, and J. de Gruyter. 1990. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. Stud. Mycol. 32:3–19.

Wang, Y. Y. 2014. Study on Foot Rot and Dry Rot of Sweet Potato in Northern Taiwan. Master Thesis, Master Program for Plant Medicine, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 61 pp. (in Chinese with English abstract)

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp.

Study on Sweet Potato Storage Disease and Etiology

Chao-Jung Wu[1], Hong-Ren Yang[2], Ching-Yi Lin[1], Chiao-Wen Huang[3], Sui-Li Hsu[4], Su-Yu Lai[4], and Hui-Fang Ni[5,*]

Abstract

Wu, C. J., H. R. Yang, C. Y. Lin, C. W. Huang, S. L. Hsu, S. Y. Lai, and H. F. Ni. 2019. Study of sweet potato storage disease and etiology. J. Taiwan Agric. Res. 68(1):28–39.

Post-harvest storage disease is one of the important limiting factor of sweet potato production. To investigate the incidence of post-harvest storage disease on sweet potato, healthy roots from Dacheng Township, Changhua County and Shueilin Township, Yunlin County were collected and stored under 15℃ for 12 wk, and fungi on rotten roots were isolated every 2 wk in period of storage. After 12 wk of storage, 436 of 504 roots from Dacheng Township and 223 of 500 roots from Shuelin Township were rotten, and isolated fungal species included *Diaporthe batatas*, *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis destruens* and other *Phomopsis* spp. Pathogenicity tests were conducted, and results showed that *D. batatas*, *L. theobromae*, *M. phaseolina*, *P. destruens* and some *Phomopsis* spp. were virulent, and could cause rotten symptoms on sweet potatoes, revealing the pathogenicity of these species. On the contrary, roots inoculated with *Fusarium* spp. did not show symptom. This study provides important reference for further fungicides screening to control the post-harvest disease of sweet potato in Taiwan.

Key words: Sweet potato, Storage disease, Dry rot, Black rot, Charcoal rot.

Received: April 24, 2018; Accepted: August 28, 2018.

* Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw

1 Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

2 Research Fellow and Director, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

3 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

4 Research Assistants, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

5 Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(1):40–46 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201903_68(1).0004

研究報告

評估套袋保護時間及網目大小於「台農 1 號」荔枝對荔枝細蛾防治效果

王泰權[1]　張哲瑋[2]　張仁育[3,*]

摘要

王泰權、張哲瑋、張仁育。2019。評估套袋保護時間及網目大小於「台農 1 號」荔枝對荔枝細蛾防治效果。台灣農業研究 68(1):40–46。

荔枝細蛾 (*Conopomorpha sinensis* Bradley) 為荔枝果實生長發育過程中危害最甚的害蟲之一，生產者通常藉由施灑化學殺蟲劑以快速、有效地控制該害蟲。套袋是另一個選擇方案，可藉此提供友善環境與安全果品。荔枝品種「台農 1 號」因其穩定高產，深具發展為減藥生產品種潛力。結合該品種與適當的套袋處理，可作為安全荔枝生產的解方之一。本研究著重於「台農 1 號」荔枝套網袋生產的 2 項重要議題，包含套袋時機及所用網目大小對防治荔枝細蛾入侵的效果。研究中據此以套袋的時機及套袋材質孔徑兩項作為探討因子，並藉由追蹤落果表現、果實品質及危害情形來評估套果效益。研究結果顯示，在偏雌花盛開後 3 wk 套袋，可使生殖生長枝收穫最多且果實不受蟲害；未套袋的荔枝果實受害率則達到 97.5%，且單果重量減少 26.9%，可溶性固形物含量亦低於 17°Brix。另外，使用 16 網目，並無法全然防範荔枝細蛾對果實的危害。因此，建議使用更細緻的網目，作為防範荔枝細蛾危害的套袋材料。

關鍵詞：荔枝細蛾、套袋、果實品質、產量、網目。

前言

荔枝細蛾 (*Conopomorpha sinensis* Bradley) 為鱗翅目 (Lepidoptera)、細蛾科 (Gracillariidae)，係荔枝重要害蟲 (Hwang & Hsieh 1989; Hwang & Hung 1996)，危害荔枝新梢與果實，尤其於結果期對果實所致危害甚鉅。荔枝細蛾於夜間在果實上產卵，幼蟲孵化後直接入侵取食荔枝蒂頭及種子，可於荔枝果實生長初期入侵常造成大量落果，而入侵收穫枝則造成果實品質不佳 (Huang *et al*. 1994)。即使施藥進行荔枝細蛾的防治，在不同荔枝品種間果實受害率仍有 8.5–47.0%，不施化學藥劑防治之果實危害率甚至可高達 86.2–88.5% (Hung *et al*. 2008)，顯示該害蟲嚴重減損荔枝生產效益。

荔枝細蛾產卵於果實表面，卵期約為 2.8–3.0 d (Hung *et al*. 2002)，幼蟲孵化後會直接入侵果皮取食果實內部組織，此時不易以化學藥劑防治幼蟲危害。因此，生產者常採用連續化學防治，控制荔枝著果期田間害蟲。根據我國現行植物保護手冊推薦荔枝細蛾防治所用殺蟲藥劑，包含有機磷劑、合成除蟲菊類及氨基甲酸鹽類等，約於荔枝花落後 10–20 d 起，每隔 7–10 d 進行施藥一次直至指定停止施藥期前，按此所需施藥次數約為 4–5 次。然而，荔枝生產過程時有梅雨等天候因素干擾，生產者往往增加用藥次數以確保果實不受蟲害，對施藥者與環境均造成負擔與危害風險。

除了使用化學藥劑防治荔枝細蛾外，套袋保護為非常有效直接阻隔荔枝細蛾產卵於

投稿日期：2017 年 12 月 15 日。接受日期：2018 年 8 月 29 日。
* 通訊作者：r96b44007@ntu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所園藝系研究員兼系主任。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所園藝系助理研究員。台灣 嘉義市。

荔枝果實上的方式。以往荔枝細蛾套袋研究結果，皆顯示可以獲得良好的防治效果。Wen & Liou (2008) 及 Wen & Lee (2009) 於高雄鳳山及旗山地區的玉荷包荔枝上，套以 30 cm × 50 cm 綠色尼龍網袋、30 cm × 50 cm 白色尼龍網袋及 35 cm × 40 cm 紙袋，進行荔枝細蛾套網防治試驗。荔枝細蛾之防治率，分別可達 89.1–100、93.4–100 及 88.4–97.1%。Hwang & Hung (1993) 於南投地區南崗及社口 2 處，以 100 目 60 cm × 40 cm 之白色尼龍紗網進行套袋，收穫時並無發現任何荔枝細蛾危害，顯示套袋可以有效地防治荔枝細蛾。過去研究文獻較於探討荔枝套袋適用時間，由於荔枝果實發育過程伴隨大量生理落果，因此早期套袋效率不佳，太晚套袋則又有荔枝細蛾等害蟲危害果實、減損產量等問題。綜此，尋求精確套袋時間，將可有助於生產者獲得最佳生產報酬。

本研究選用「台農 1 號」荔枝作為試驗材料，該品種具有發育時間短且著果穩定的豐產特性 (Chang *et al*. 2005)，可供發展有機耕作或居家種植潛力。本研究以偏雌花盛開期為基準，探討不同套袋時間與網目大小對荔枝生產與蟲害作用影響，冀能提供荔枝套袋生產模式，並予友善環境種植參考。

材料與方法

套袋時間對荔枝細蛾危害及果實品質之影響

試驗採隨機完全區集設計 (Randomized complete block design; RCBD)，2014 年以行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所園區所栽植之 5 株「台農 1 號」荔枝樹單株作為區集，每株標示 25 支偏雌花同步盛開全花序 (穗)，並自其中逢機挑選 5 支進行各別套袋。試驗中以尺寸 36 cm × 45 cm 之 FP460 綠色聚乙烯網袋 (南洋化學工業股份有限公司，台灣嘉義縣) 作為套袋材料，分別於偏雌花盛開後第 3 週、第 5 週與第 7 週進行套袋處理，使著果的穗 (生殖生長枝) 完整包覆於網袋之中。偏雌花盛開後第 3 週套袋時，另擇 5 支生殖生長枝以破網袋套袋處理：套袋後以美工刀自束口至袋底將網袋一線劃開，最後所餘 5 支生殖生長枝則不套袋作為對照。

網袋大小對荔枝細蛾危害及品質之影響

2015 年於農業試驗所嘉義分所荔枝園 3 株「台農 1 號」進行，以單株作為區集，每株標示 20 支偏雌花同步盛開全花序 (穗)，並自其中逢機挑選 5 支進行各別套袋處理。試驗中所用套袋材料為自製 55 cm × 40 cm 長型白色尼龍網袋，網袋孔徑則分成 16、24 及 32 目 3 等級。網袋上方以拉繩束口，底部設魔鬼氈，便於逐週調查時取樣。受試荔枝偏雌花盛開後第 3 週進行套袋，每試驗株每種網袋各逢機套於 5 支生殖生長枝，並擇 5 支未套袋生殖生長枝標示作為對照。

留果率、荔枝細蛾危害率計算與果實品質分析

2014 年試驗自偏雌花盛開日起，每週記錄各生殖生長枝每穗著生小果數，至偏雌花盛開後第 11 週採收果實 (Yeh *et al*. 2011)。逐週每穗著果數參考 Chang *et al*. (2015) 方法，計算週間相對落果率 (relative fruit abssion rate)。採收後的果實，逐一以肉眼檢視是否受到荔枝細蛾的入侵危害，出現荔枝細蛾幼蟲羽化蛀孔、幼蟲糞便或者活體幼蟲入侵，皆視為受到入侵。各試驗株收穫果實，每處理逢機抽取 5 顆果實進行品質分析，秤取單果與果皮、果肉、種子等各部位鮮重，以手持式曲折度計測量單果果肩部位可溶性固形物含量，以及榨取果汁後測量果汁可溶性固形物含量與可滴定酸含量計算糖酸比 (Chang *et al*. 2015)，分析果實品質。

2015 年試驗於套袋後逐週計算每標示穗留存果實數量，自偏雌花盛開後第 7 週起，於各網袋中分別拾出週間落果，並逐一檢視是否受荔枝細蛾危害。果實至偏雌花盛開後第 10 週果實達到園藝成熟，全數予以採收，並調查記錄收穫果實危害率。

統計分析

試驗數據以 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 軟體線性模型

程式分析，並以 Tukey's Honest Significant Difference (Tukey's HSD) 比較各處理間差異 (α = 0.05)。其中，相對落果率與危害率數據，先經反正弦 (arcsine) 函數轉換後分析。

結果

落果趨勢

「台農 1 號」荔枝果實著果、落果高峰，發生於偏雌花盛開後第 2–3 週間，在第 3 週之前各處理落果率平均約達 89.1% 左右，而到第 5 週時已約有 96.5% 小果掉落。各處理間平均每生殖生長枝週間相對落果率在第 10 週前，於 Tukey's HSD 標準下無顯著差異，然而相較於其他處理，不套袋對照組則在第 11 週採收出現另一波落果 (圖 1)。

果實危害率

在 2014 年的試驗中，發育 11 wk 採收「台農 1 號」荔枝果實，每生殖生長枝平均著生 1.80–3.40 顆果實，套袋未造成收穫量顯著差異；進一步解剖收穫果實予以鏡檢，則可觀察到在發育 3 wk 與 5 wk 時套袋所收穫果實並無荔枝細蛾蛀孔或活體幼蟲入侵，而在不套袋對照組中則有高達 97.5% 果實受荔枝細蛾危害。剔除受害果實，於 3 wk 套袋處理可獲得平均每穗收穫 3.40 顆果實，顯著優於不套袋對照組的 0.12 顆果實 (表 1)。

在 2015 年進行的試驗中，不套袋生殖生長枝收穫果實於採收時，有 87.5% 遭受荔枝細蛾危害，每穗平均僅能收獲 0.53 顆果實；以 16、24 及 32 目網袋套袋均高於不套袋處理，生殖生長枝每穗平均可收獲 4.87–6.80 顆無受蟲害的果實，在 24 目及 32 目網袋內收穫果實均無蟲害情形 (表 2)。

果實品質分析

果實品質分析結果顯示，不套袋對照組果實明顯較小，單果重較於第 3 週套袋處理者減少約 26.9%。果重減損主要來自果肉部分充實不足，在第 3 週套袋處理者果肉重達 22.35 g，不套袋對照組果實果肉僅 15.16 g。另外，對照組果實亦有果肉可溶性固形物含量無法充分累積情形，在經套袋處理的「台農 1 號」果

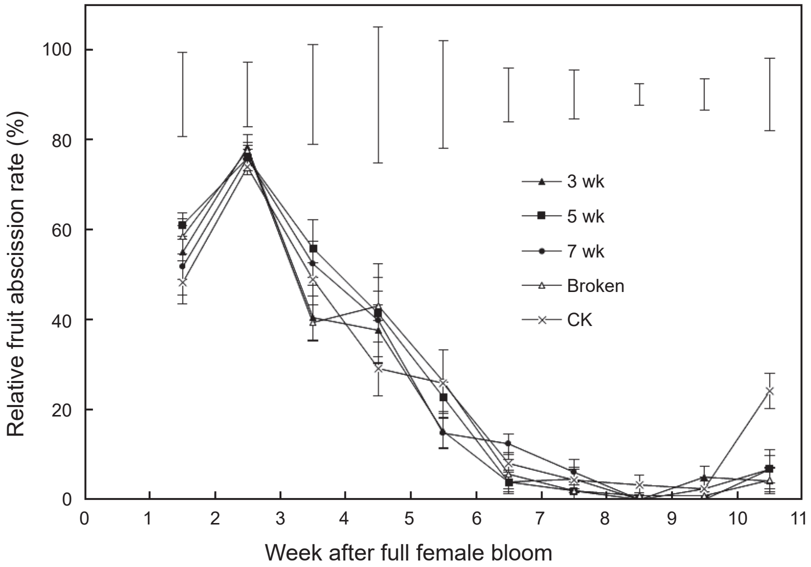

圖 1. 偏雌花盛開後 3 wk、5 wk、7 wk 進行套袋及偏雌花盛開後 3 wk 套用破袋或不套袋做對照處理，穗上果實週間相對落果率變化。圖上垂直線為顯示各階段 least significant difference (LSD) 值 (α = 0.05)。

Fig. 1. Changes of weekly relative fruit abscission rate in panicles with different treatments, including bagged since 3 wk, 5 wk, and 7 wk after full female bloom, or used broken bag at 3 wk, or without bagging. Vertical bars represent least significant difference (LSD) (α = 0.05). CK: control.

表 1. 不同時間與套袋處理對「台農 1 號」荔枝著果、荔枝細蛾危害率與果實品質影響。

Table 1. Effects of different bagging treatments on fruit retention, infestation rate of litchi fruit borer, and fruit quality of litchi 'Tainung No. 1'.

Treatment	Non-infested fruit number per panicle	Infestation rate of harvested fruit (%)	Fruit weight (g)	Pericarp weight (g)	Seed weight (g)	Aril weight (g)	TSS (°Brix)	TSS/TA[z]
3 wk	3.40 a[y]	0.0 a	28.01 a	4.16 a	1.50 a	22.35 a	18.46 a	130.65 a
5 wk	1.80 ab	0.0 a	27.63 a	4.09 a	1.30 a	22.24 a	18.62 a	147.57 a
7 wk	1.84 ab	10.6 a	27.68 a	4.01 a	1.49 a	22.18 a	19.22 a	131.74 a
Broken	2.36 ab	17.1 a	26.23 a	3.96 a	1.33 a	20.94 a	18.98 a	141.26 a
CK[x]	0.12 b	97.5 b	20.48 b	3.95 a	1.37 a	15.16 b	16.32 b	115.29 a

[z] TSS: total soluble solids; TA: titratable acidity.
[y] Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level (α = 0.05) by the least significant difference (LSD) test.
[x] CK: control.

實可溶性固形物含量平均在 18.46–19.22°Brix 之間，顯著的高於對照組的 16.32°Brix (P = 0.0003)。

荔枝果實套袋後的顏色分析

「台農 1 號」荔枝果實於轉紅之初具有最佳果實品質表現，在 2014 年收穫果實的外觀色澤，無論在各套袋處理或不套袋對照組中，均無明顯差異 (圖 2)。

討論

荔枝果實發育過程約僅 1–5% 小果可留存至採收期 (Stern & Gazit 1999; Chang *et al*. 2015)，其餘小果因生理落果以及病蟲害而損失。Hung *et al*. (2008) 調查資料顯示，在未施藥荔枝園中，樹上果與地上落果之荔枝細蛾危害率隨著接近採收期而提高。本試驗不套袋對照組，生殖生長枝所見相對落果率與其他套袋處理組未有顯著差異，但採前落果率顯著地攀升 (圖 1)。顯示「台農 1 號」果實發育早、中期落果發生，主要源自生理性落果，而荔枝細蛾的危害主導了荔枝果實發育後期的落果。荔枝細蛾入侵動態尚缺乏更深入的瞭解，本研究透過分批套袋結果，明確地呈現了在偏雌花盛開後第 3 週實施套袋，可收穫最多的良質果實，收穫果實亦無一受荔枝細蛾危害。荔枝細蛾果園內密度於荔枝小果期開始快速增加 (Wen & Lee 2009)，推測在「台農 1 號」荔枝果實發育 5 wk 以前，即種子胚胎快速發育之初 (Yeh *et al*. 2011)，荔枝小果非生理性落果現象便已少量發生。荔枝細蛾是否於此時入侵小果並造成危害能力，則待進一步研究觀察。

套袋可有效地阻絕蛀果害蟲於果實上產卵並所致危害，目前使用套網袋的保護措施，已經廣泛用於防治果實蠅科及蛀果蛾類的等害蟲 (Wen & Liou 2008; Sarker *et al*. 2009)。研究中在第 3 週套用破損網袋的處理組，至採收期果實荔枝細蛾危害率為 17.1%，仍顯優於不套袋環境生產的果實。顯示物理性阻絕，可有效地減少荔枝細蛾入侵。研究中採用不同孔徑的觀察套袋過程中荔枝細蛾的危害情形，16、24 及 32 目網袋均能提供良好的荔枝細蛾防治效果，然而果實發育第 8 週時套 16 目網袋，記錄到袋內有荔枝細蛾危害落果情形，且收穫果實中亦見蟲害果實 (表 2)。由於荔枝細蛾卵期至完成幼蟲期約需 13–17 d，顯示該入侵事件發生於套袋之後，意味著在 16 目 (篩孔尺寸 1.18 mm) 以下孔徑之套袋尚不足以完全抵禦荔枝細蛾入侵。

荔枝細蛾危害發育中的荔枝果實時，顯著抑制果肉充實，使得著生果實較小且可溶性固形物含量低，推測係因維管束組織受破壞影響同化物輸導所致。然而，荔枝著果與果實發育仰賴枝梢即時供應光合同化物 (Chang & Lin 2008)，套袋會改變包覆範圍微環境條件，包含晝期氣溫增加約 1–2℃以及光照度降低，而影響果實發育、著色表現及果品品質呈現等。例如，套袋可能使荔枝果實生長發育較慣行施

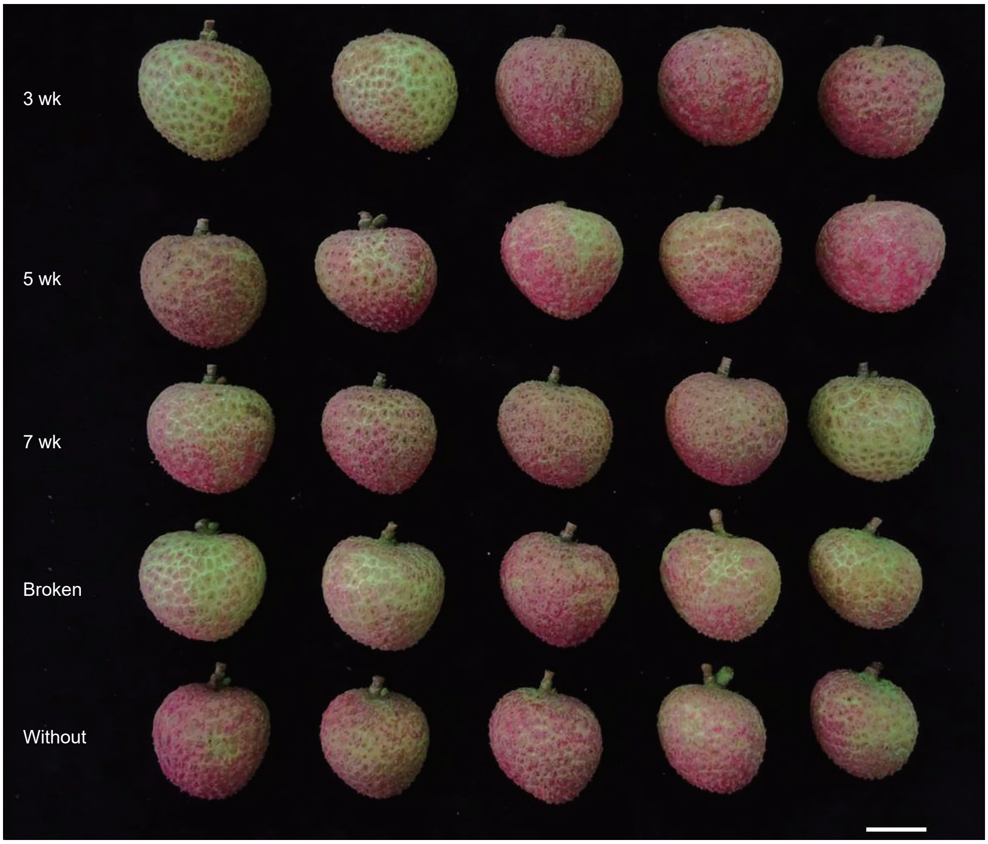

圖 2.　以綠色聚乙烯網袋套袋處理「台農 1 號」荔枝所穫果實外觀，由上而下分別為偏雌花盛開後第 3 週、第 5 週、第 7 週套袋，偏雌花盛開後第 3 週套破網袋處理，以及不套袋處理。Bar = 2 cm。

Fig. 2.　Appearance of 'Tainung No. 1' litchi fruit after green polyethylene net bagging treatments. From top to bottom: bagging at 3, 5 and 7 wk after full female bloom, after full female bloom, or used broken bag at 3 wk, or without bagging. Bar = 2 cm.

表 2.　套袋網目大小對「台農 1 號」荔枝著果與荔枝細蛾危害率影響。

Table 2.　Effects of mesh size on bagged litchi 'Tainung No. 1' fruit retention and infestation rate of litchi fruit borer.

Treatment	Non-infested fruit number per panicle	Infestation rate of harvested fruit (%)	Infestation rate calculated since 6 wk after full female flower blooming (%)
16-mesh bag	6.00 a[z]	2.3 a	1.8 a
24-mesh bag	6.80 a	0.0 a	0.0 a
32-mesh bag	4.87 a	0.0 a	0.0 a
CK[y]	0.53 b	87.5 b	–

[z] Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level (α = 0.05) by the least significant difference (LSD) test.
[y] CK: control.

藥管理者延滯，或因葉綠素代謝與花青素生合成量改變，使得套用不同材質會獲得不同色澤果實 (Fang *et al*. 2016)。因此，投入集約人力完成套袋措施，採用與否便將關乎生產者果實生產與經濟表現的取捨。本研究說明使用網袋生產「台農 1 號」荔枝，以偏雌花盛開後 3 wk 後、5 wk 以前套袋，可有最佳保護效果與著果量，網袋孔徑則以小於 16 目為宜，可供作

未來荔枝生產期蟲害防治研究以及應用網材生產參考。

誌謝

本研究感謝農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系林玄學先生、黃瓊慧小姐及盧慧真小姐協助進行不同套袋時間防治荔枝細蛾的田間試驗；朱宜芬小姐及周紹宸先生協助不同網袋大小防治田間細蛾的田間試驗。

引用文獻

Chang, J. W., Y. H. Cheng, C. R. Yen, H. T. Hsu, C. N. Chao, Y. J. Tien, C. C. Ho, and C. Y. Lin. 2005. A new variety of litchi (*Litchi chinesis* Sonn.) ‘Tainung No 1’. J. Taiwan Agric. Res. 54:43–53. (in Chinese with English abstract)

Chang, J. C. and T. S. Lin. 2008. Fruit yield and quality as related to flushes of bearing shoots in litchi. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 133:284–289.

Chang, J. Y., Y. A. Chang, L. Tang, and J. W. Chang. 2015. Characterization of generative development in early maturing litchi ‘Early Big’, a novel cultivar in Taiwan. Fruits 70:289–296.

Fang, H. H., W. L. Lee, C. C. Huang, and Y. S. Liang. 2016. Effect of bagging materials on pericarp coloration and pesticide residues of ‘Yu-Her-Pao’ litchi (*Litchi chinensis* Sonn) fruit. J. Taiwan Agric. Res. 65:184–193. (in Chinese with English abstract)

Huang, C. C., K. S. Chang, and Y. I. Chu. 1994. Damage and populations fluctuation of the litchi fruit borer, *Conopomorpha sinensis* Bradley, in Chia-Nan district, Taiwan. Plant Prot. Bull. 36:85–95.

Hung, C. C., B. Y. Chang, and J. S. Hwang. 2002. Rearing techniques, eclosion and mating behavior of litchi fruit borer, *Conopomorpha sinensis* Bradley (Lepidoptera: Gracillariidae). Plant Prot. Bull. 44:89–99.

Hung, S. C., K. Y. Ho, and C. C. Chen. 2008. Investigation of fruit damages of litchi caused by *Conopomorpha sinensis* Bradley and *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Chaiyi. J. Taiwan Agric. Res. 57:143–152. (in Chinese with English abstract)

Hwang, J. S. and F. K. Hsieh. 1989. The bionomic of the coca pod borer, *Conopomorpha cramerella* (Snellen), in Taiwan. Plant Prot. Bull. 314:387–395.

Hwang, J. S. and C. C. Hung. 1993. Control of the litchi fruit borer, *Conopomorpha sinensis* Bradley, with bagging method and insecticides. Plant Prot. Bull. 35:225–238. (in Chinese with English abstract)

Hwang, J. S. and C. C. Hung. 1996. Gracillariid insect pests attacking litchi and longan in Taiwan. Plant Prot. Bull. 38:75–78.

Sarker, D., M. M. Rahman, and J. C. Barman. 2009. Efficacy of different bagging materials for the control of mango fruit fly. Bangl. J. Agric. Res. 34:165–168.

Stern, R. A. and S. Gazit. 1999. The synthetic auxin 3, 5, 6-TPA reduces fruit drop and increases yield in ‘Kaimana’ litchi. J. Hortic. Sci. Biotech. 74:203–205.

Wen, H. C. and T. D. Liou. 2008. Insect pests and their injuries on Yuh-heh-bau litchi and effect of fruit bagging in Kao-Ping area of Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 57:133–142. (in Chinese with English abstract)

Wen, H. C. and C. Y. Lee. 2009. A control for three pests of the Yuh-heh-pau litchi on the fruit stage. Formosan Entomol. 29:95–102. (in Chinese with English abstract)

Yeh, Y. C., J. W. Chang, C. H. Tang, F. T. Lin, and T. C. Lee. 2011. Study on the development of ‘Tainung No.1’ and ‘Hak Ip’ litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruits. J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 57:65–79. (in Chinese with English abstract)

Assessment of Bagging Protection at Different Timings and Mesh Sizes for Controlling Litchi Fruit Borer (*Conopomorpha sinensis* Bradley) on Litchi 'Tainung No. 1'

Tai-Chuan Wang[1], Jer-Way Chang[2], and Jen Yu Chang[3,*]

Abstract

Wang, T. C., J. W. Chang, and J. Y. Chang. 2019. Assessment of bagging protection at different timings and mesh sizes for controlling litchi fruit borer (*Conopomorpha sinensis* Bradley) on litchi 'Tainung No. 1'. J. Taiwan Agric. Res. 68(1):40–46.

Litchi fruit borer (*Conopomorpha sinensis* Bradley) is the most important pest during the fruit growth and development in litchi. Generally growers use chemical pesticides to control pest efficiently. Bagging is an alternative method, providing suitable growing environment and safe fruit. The litchi variety 'Tainung No. 1' may have potential to develop into a low pesticide used variety due to its stable and high yield traits. A combination of suitable variety and bagging practices could be the resolution for production of safe litchi. This study considered two important approaches, timing and mesh size of net, for the experiment. Best fruit bearing without pest infestation was observed on panicles which had bagged at 3 wk after full female bloom. About 97.5% fruit from unbagged panicles were infested by litchi fruit borer, with 26.9% fruit weight loss and reduction of total soluble solids content (less than 17°Brix). In summary, 16-mesh net cannot absolutely protect fruit from damage by litchi fruit borers. It is recommended to use the more fine materials.

Key words: Litchi fruit borer, Bagging, Fruit quality, Yield, Mesh.

Received: December 15, 2017; Accepted: August 29, 2018.

* Corresponding author, e-mail: r96b44007@ntu.edu.tw

1 Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

2 Research Fellow and Head, Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

3 Assistant Research Fellow, Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(1):47–58 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201903_68(1).0005

研究報告

由 *Exserohilum rostratum* 引起之蝴蝶蘭花瓣斑點病

黃巧雯[1] 黃晉興[2] 蔡志濃[2] 張立祥[3] 謝廷芳[4,*]

摘要

黃巧雯、黃晉興、蔡志濃、張立祥、謝廷芳。2019。由 *Exserohilum rostratum* 引起之蝴蝶蘭花瓣斑點病。台灣農業研究 68(1):47–58。

2017 年 4 月於台南地區一處蘭園發現蝴蝶蘭花瓣上產生褐色圓形凹陷病斑，大多數病斑產生後不會繼續擴大，但嚴重影響花卉觀賞品質，依病徵形態將本病稱為蝴蝶蘭花瓣斑點病 (petal spot)。由罹病組織所分離之可疑病原菌，於 Potato dextrose agar (PDA) 平板培養時產生黑灰色茂密菌絲，其分生孢子 (conidia) 為褐色至深褐色長橢圓形，於分生孢子末端突出黑褐色之臍 (hilum)。依據科霍氏法則 (Koch's postulates) 完成病原性測定，並由本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子鑑定結果等將病原菌鑑定為 *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs。本菌最適菌絲生長溫度為 28℃，而最適孢子發芽溫度為 24–36℃。病原菌不僅危害白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3') 外，亦可在粉黃花 (*Phalaenopsis* Green Pixie 'Ever Green') 及桃紅 (*Phalaenopsis* Queen Beer 'Mantefon') 蝴蝶蘭、黃花文心蘭 (*Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel')、嘉德麗雅蘭 (*Cattleya* Chien Ya 'Ocean') 及白花萬代蘭 (*Vanda* Princess 'Mikasa White') 花瓣上造成類似病徵。測試殺菌劑對本菌之菌絲生長及孢子發芽之影響，結果顯示快得寧、撲滅寧、待克利及依普同在 10 mg a.i. L^{-1} 有效濃度下對菌絲生長抑制率均可達 90% 以上，而快得寧、鋅錳乃浦、四氯異苯腈及氫氧化銅在 10 mg a.i. L^{-1} 有效濃度下則可顯著降低病原菌之孢子發芽率。本文為國內第一篇闡明由 *E. rostratum* 引起蝴蝶蘭花瓣斑點病之報告，並初步篩選防治藥劑供栽培業者參考使用。

關鍵詞：蝴蝶蘭、花瓣斑點病、藥劑篩選。

前言

蝴蝶蘭為蘭科 (Orchidaceae) 蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*)，其名是由希臘文的 phalaina (蝶蛾) 與 opsis (形象) 兩字結合命名而來，主要以其花型有如蝴蝶翩翩飛舞而得名 (Taiwan Orchid Growers Association 2018)。原生地分布於南北緯 23 度之間，蝴蝶蘭屬植物之原生種約 50 幾種，台灣有兩種原生蝴蝶蘭，一為白蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis amabilis* var. *formosana*)，另一為桃紅蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis equestris* Schauer Rchb. F.) (Council of Agriculture, Executive Yuan 2006)，性喜高溫多溼、通風佳、耐旱、耐陰環境。依據行政院農業委員會統計資料顯示，2016 年全台種植蘭花面積為 745 ha，其中蝴蝶蘭種植面積約 250 ha，出口產值逾一億美元，主要銷於歐洲、美國、日本及越南等地區，為台灣四大旗艦外銷農產品之一。

根據台灣植物病害名彙 (Hsu *et al*. 2002) 及相關研究報告紀錄，在台灣蝴蝶蘭主要病害有由東亞蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CyMV)、齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*; ORSV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 引起之病毒病；

投稿日期：2018 年 6 月 20 日；接受日期：2018 年 9 月 19 日。
* 通訊作者：TFHsieh@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
4 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼主任。台灣 雲林縣。

由 *Sclerotium rolfsii* Sacc. 引起之白絹病、由 *Colletotrichum phalaenopsidis* Penzig 引起之炭疽病、由 *Pseudocercospora dendrobii* Goh & Hsieh 引起之石斛蘭葉斑病、由 *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. 引起之灰黴病等真菌性病害；另有由 *Phytophthora parasitica* Dastur、*Phytophthora palmivora* Butler、*Phytophthora multivesiculata* Ilieva, Man in't Veld, Veenbaas-Rijks & Pieters 引起之疫病，以及由 *Acidovorax cattleyae* (Pavarino) Schaad *et al*. 引起之褐斑病、由 *Dickeya dadantii* Samson *et al*. 引起之細菌性軟腐病等細菌性病害。而在 2017 年 4 月中旬，本實驗室從台南地區蘭花園之白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3') 罹病花瓣上，經鏡檢時發現 *Exserohilum* 之孢子。由國外文獻得知，引起蘭花 (石斛蘭，*Dendrobium*) 花器壞疽斑點的原因，不僅只由灰黴病菌 *B. cinerea* 所造成，尚有其他病原如 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.、*Bipolaris setariae* Shoemaker、*Bipolaris urochloae* (Putterill) Shoemaker、*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker、*Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs 及 *Stemphylium* sp. 等，皆於花瓣上產生黑褐色壞疽斑點 (blossom necrotic fleck; blossom flecks and spots) 病徵 (Uchida & Aragaki 1979; Kawate & Sewake 2014)。爾後，將罹病組織經病原分離純化、病原性測定、形態特徵及分子鑑定後，發現是由 *E. rostratum* 引起之病害，並定名為花瓣斑點病 (petal spots)。

E. rostratum 為廣泛分布於亞熱帶及熱帶地區，其寄主範圍廣如玉米、水稻、甘蔗、高粱、番茄、小麥、菸草、單子葉植物之雜草及橡膠樹 (Leonard 1976; Anahosur & Sivanesan 1978; Liu *et al*. 2016; Majeed *et al*. 2016; Zhang *et al*. 2016) 等，其所造成之病徵有葉斑、葉枯及莖腐爛等。本菌分布於非洲 (南非、尼日利亞、毛里求斯、蘇丹)、亞洲 (中國、印度、以色列、巴基斯坦)、中美洲 (波多黎各)、歐洲 (丹麥) 及北美 (美國) 等區域 (Leonard 1976; Anahosur & Sivanesan 1978)；台灣則於 1992 年發現本菌感染玉米葉片引起玉米葉斑病 (Tsai *et al*. 2001)。然而，在台灣並未見有關由 *E. rostratum* 引起之蝴蝶蘭花瓣斑點病相關研究，亦無推薦藥劑可資使用。

蘭花屬於高經濟價值之觀賞植物，若花朵上呈現病斑不僅影響觀賞價值，亦減低消費者選購的慾望，尤其是切花產品，將嚴重影響商品價值。為避免未來造成大量經濟損失 (Uchida & Aragaki 1991)，本研究擬探討該病原菌的形態、生理特性、病原性測定及室內防治藥劑篩選，以提供此病害防治上之參考。

材料與方法

供試菌株之分離、培養及保存

將罹患花瓣斑點病之花瓣取下，並以解剖刀切下病斑之病健部組織，以 75% 酒精表面消毒後，置於以 2% (w/v) 水瓊脂 (Water agar; WA) 平板上。待病組織長出菌絲後，以移植針切取菌絲尖端移到馬鈴薯葡萄糖瓊酯培養基 (potato dextrose agar; PDA) 上培養。選取分離所得之菌株 EX001 及 EX002 分別置於 PDA 中培養 5 d 後，再挑取菌絲塊移植於含滅菌木麻黃針葉之 2% (w/v) WA 平板上，待其產孢後，進行單孢分離。單孢後分離株，移至 2% (w/v) WA 培養基上培養，並將菌絲塊置入裝無菌水之保存管中，於 24℃定溫室保存待用。

病原菌形態及分子鑑定

將 EX001 及 EX002 菌株培養於 PDA 培養基上，置於 24℃培養約 7 d 後，觀察菌落生長型態。待其產孢後，以滅菌之針頭挑取培養基上之分生孢子置於載玻片上，並以干涉位相差顯微鏡 (differential interference contrast; DIC, LEICA DM 2500, Leica DM, Wetzlar, Germany) 進行孢子型態觀察與拍照，以 NIS-Elements Analysis D 4.51 軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 測量 50 個以上分生孢子之長度及寬度。分子鑑定方式，則是將菌株於 24℃下培養於 PDA 培養基上。經 6 d 後，隨即委託源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taichung, Taiwan) 進行 DNA 萃取與聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 之分子鑑定工作，增幅 internal transcribed spacer

(ITS) 部分片段時所使用之引子對為 ITS4 及 ITS5 (White *et al*. 1990)。定序結果在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資料庫中進行序列分析比對，並將序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

接種源配製及病原性測定

將 EX001 分離株培養於含滅菌後木麻黃針葉之 2% (w/v) WA 平板上，置於 24℃、12 h 光照下培養約 6 d 後，以無菌水洗下培養皿內之分生孢子。利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, Miami, FL, USA) 測定孢子濃度，再以無菌水製成孢子懸浮液 (10^5 spores mL^{-1})。續將孢子懸浮液分別均勻噴布於白花蝴蝶蘭 (*Phal*. Sogo Yukidian 'V3')、桃紅 (*Phal*. Queen Beer 'Mantefon') 及粉黃蝴蝶蘭 (*Phal*. Green Pixie 'Ever Green')、黃花文心蘭 (*Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel')、嘉德麗雅蘭 (*Cattleya* Chien Ya 'Ocean') 及白花萬代蘭 (*Vanda* Princess 'Mikasa White') 等花朵上，並置於 24℃走入式植物生長箱中光照 12 h。接種後，隨即進行套袋保濕 2 d 後去除塑膠袋，並於接種後每 2 d 調查病勢進展情形。對照組則以無菌水進行接種，每個處理 3 重覆，本試驗重複進行 2 次。

溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將 EX001 及 EX002 菌株分別移植於 PDA 培養基平板上，並置於室溫培養 6 d 後，以口徑 0.6 cm 滅菌過之打孔器切取菌絲邊緣，將菌絲塊置於 PDA 平板中央。分別置於 8、12、16、20、24、28、32、36 及 40℃之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 5 天測量其菌絲生長之直徑。每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。另外，將 EX001 及 EX002 菌株分別培養於含木麻黃葉之 WA 上，待其產孢後，以無菌水配製約 10^4 spores mL^{-1} 之孢子懸浮液，再以無菌微量吸管吸取 20 μL 供試菌株之孢子懸浮液置於 8 孔載玻片上，並將玻片保濕於塑膠培養皿中。分別置於 8、12、16、20、24、28、32、36 及 40℃之定溫箱中，於 6 h 後取出於顯微鏡計算 100 個孢子之發芽情形。每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。

殺菌劑對病原菌菌絲生長之影響

將培養於 PDA 平板上 6 d 之 EX001 及 EX002 供試菌株，以滅菌過之打孔器 (孔徑 0.6 cm) 切取菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。所測試的藥劑為目前推薦在作物葉斑病真菌性病害防治之藥劑，藥劑種類如下：70.0% 甲基多保淨可濕性粉劑 (wettable powders; WP) (thiophanate methyl，瑞總股份有限公司，台灣台北市)、40.0% 快得寧 WP (oxine-copper，嘉泰企業股份有限公司，台灣桃園市)、50% 撲滅寧 WP (procymidone，台灣住友化學股份有限公司，台灣台北市)、53.8% 氫氧化銅水分散性粒劑 (water dispersible granules; WG) [copper (II) hydroxide，安農股份有限公司，台灣新北市]、80.0% 鋅錳乃浦 WP (mancozeb，安農股份有限公司，台灣新北市)、72.0% 波爾多 WP (bordeaux mixture，台灣龍燈股份有限公司，台灣台北市)、75% 四氯異苯腈 WP (chlorothalonil，興農股份有限公司，台灣台中市)、25% 待克利水懸劑 (suspension concentrates; SC) (difenoconazole，台灣先正達股份有限公司，台灣台北市)、23% 亞托敏 SC (azoxystrobin，台灣先正達股份有限公司，台灣台北市)、23.7% 依普同 SC (iprodione，雅飛有限公司，台灣台北市) 及 39.5% 扶吉胺 SC (fluazinam，台灣石原產業股份有限公司，台灣台北市) 等 11 種藥劑。將 PDA 滅菌後，冷卻至 50–70℃，添加上述藥劑種類並配置成含有效成分濃度為 1、10、100 mg a.i. L^{-1} 之 PDA 培養基平板。另以不添加藥劑之 PDA 平板作為對照，再將直徑 0.6 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 9 cm 之含藥的 PDA 平板中央，置於 24℃之定溫箱中黑暗培養。於培養後第 6 天，測量其菌絲生長之直徑。每個處理 5 重複，本試驗重複進行 2 次。試驗結果按下列公式換算藥劑對菌絲之生長抑制率：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{(\text{對照組菌落直徑} - \text{藥劑處理組菌落直徑})}{\text{對照組菌落直徑}} \times 100\%$$

藥劑對病原菌孢子發芽之影響

以滅菌微量吸管吸取 20 μL 上述不同藥劑之溶液，置於 8 孔載玻片上，再以無菌微量吸管吸取 1 μL 供試之 EX001 及 EX002 菌株孢子懸浮液 (約 200 spores μL^{-1})，滴於含農藥之載玻片內，並混合均勻，使每孔內混合液之藥劑有效成分濃度分別為 1 mg a.i. L^{-1} 及 10 mg a.i. L^{-1}。供試載玻片置於加有 5–10 mL 無菌水之 9 cm 塑膠培養皿中，將培養皿置於 24℃之定溫箱中經 16 h 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率。每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。以滅菌蒸餾水處理作為對照組。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS Enterprise Guide 7.1 版統計分析體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

結果

花瓣斑點病之病徵

本研究於 2017 年 4 月中旬在台南區蘭花園之白花蝴蝶蘭 (*Phal*. Sogo Yukidian 'V3') 樣品上，觀察到花瓣上出現褐色圓形病斑，有時病斑凹陷，病斑直徑大小約 1 mm 或更小，病斑不易擴大，有時以解剖顯微鏡可在罹病組織上觀察到病兆 (圖 1A)。

花瓣斑點病菌之培養形態與分子鑑定

花瓣斑點病菌 EX001 及 EX002 菌株培養於 PDA 平板，於 24℃黑暗培養 5–7 d 後，菌

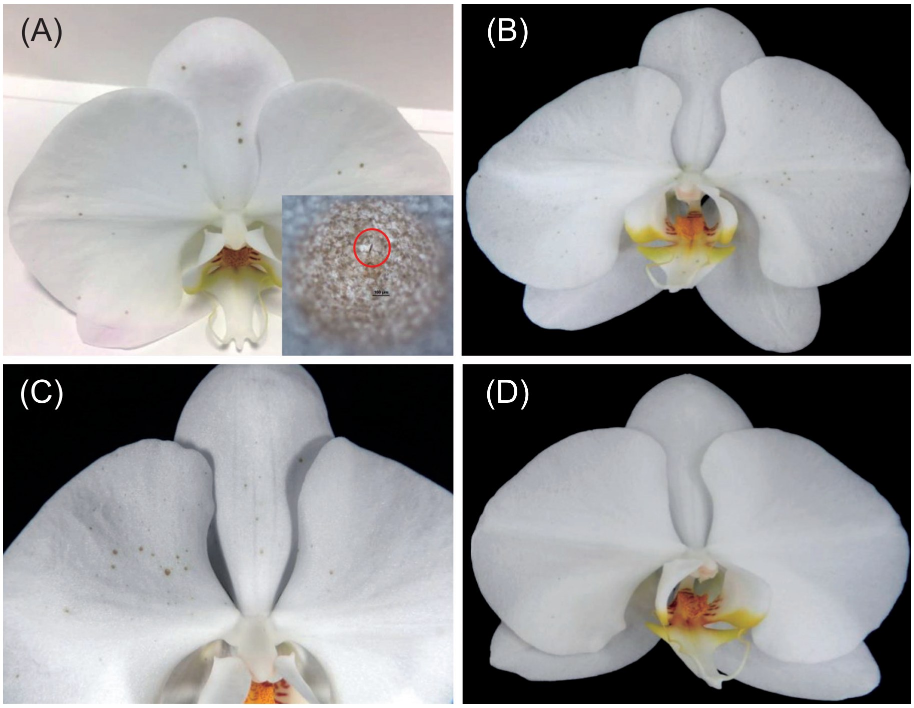

圖 1. 花瓣斑點病在蝴蝶蘭 V3 品種之花瓣上呈現的病徵。於田間自然感染所造成的病徵及罹病組織上之病兆 (紅色圈表示、標尺 = 100 μm) (A)；花瓣斑點病菌 *Exserohilum rostratum* EX-001 接種於 V3 品種花朵上之病徵表現 (B、C)；以無菌水接種之對照組 (D)。

Fig. 1. Symptoms of petal spot of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3'. Naturally infected petal caused brown small spots symptom and sign (Bar = 100 μm) (A); petal spot symptom caused by *Exserohilum rostratum* EX001 with artificial inoculation (B, C); and water inoculation as control (D).

落為灰黑色至黑色、菌絲茂密生長 (圖 2A)。利用滅菌後之針頭沾取菌落黑色區域，透過光學顯微鏡可觀察到分生孢子形態如圖 2B–2D 所示，為褐色至深褐色、長形、圓柱形、棍棒狀或長橢圓形，直線至稍微彎曲，具有 5–12 隔膜，著生於分生孢子梗上 (conidiophores)。分生孢子著生端產生突出之黑褐色臍 (hilum)，EX001 及 EX002 之孢子 (conidia) 大小分別為長寬 43.5–120.5 μm × 11.5–18.5 μm 及 57.0–153.5 μm × 10.5–18.5 μm；分生孢子梗呈屈膝狀彎曲 (geniculate)，有隔膜，表現光滑，呈灰褐色，以合軸式 (sympodial) 產孢等特性，依據 Leonard & Suggs (1974) 之形態學鑑定為 *E. rostratum*。為進一步確認菌株鑑定，將 EX001 及 EX002 分離株之 ITS (accession No. 分別為 MF186190 及 MH107245) 與 NCBI 基因資料庫進行分析比對，結果供試菌株均與 UPM1150 strain 之 ITS (KP340092) (Kusai *et al*. 2016) 之序列相似度高達 100%。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子鑑定結果，將造成花瓣斑點病之病原菌鑑定為 *E. rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs

圖 2. 花瓣斑點病菌之菌落及形態特徵。(A) 花瓣斑點病菌於 potato dextrose agar (PDA) 培養基上於 24℃培養 6 d 後的菌落形態；(B) 分生孢子梗形態；(C) 分生孢子產生於分生孢子梗上；(D) 分生孢子為褐色、長形、圓柱形、棍棒狀或長橢圓形，具有 5–12 隔膜。標尺 = 10 μm。

Fig. 2. Colony and morphological characteristics of *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs. Colony morphology of *E. rostratum* cultured on potato dextrose agar (PDA) at 24℃ for 6 days (A); conidiophores (B); conidia with conidiophores (C); and conidia are brown, long, cylindrical, stick-like or ellipsoidal with 5–12 septa (D). Bar = 10 μm.

(Telemorph: *Setosphaeria rostrata*) (Leonard & Suggs 1974; Uchida & Aragaki 1979, 1991; Kawate & Sewake 2014; Kusai *et al*. 2016)。

病原性測定

為進一步證明 *E. rostratum* 於蝴蝶蘭花瓣上之病原性，本研究將 EX001 分離株之孢子懸浮液直接噴布於蝴蝶蘭 V3 品種之白花上。於接種 3 d 後，白花花瓣開始出現淡褐色斑點病斑，於接種 5 d 後，病斑逐漸明顯並呈褐色圓形病斑 (圖 1B–1C)。之後再進行罹病組織分離，結果顯示所得菌株與接種病原菌菌株，其形態特徵皆相同，完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)，證實 *E. rostratum* 對白花 V3 蝴蝶蘭具有病原性。另以 EX001 分離株之孢子懸浮液直接噴布於桃紅色蝴蝶蘭、黃色蝴蝶蘭、黃花文心蘭、白色萬代蘭及嘉得麗雅蘭等不同種類的蘭花上，於接種 5 d 後，可在花瓣上產生淡褐色至褐色圓形病斑 (圖 3A–3E)，且在嘉德麗雅蘭花苞上有圓形、不規則形紅粉色病斑產生 (圖 3D)。而以無菌水作為對照組時，白花萬代蘭蘭花上皆未產生病斑 (圖 3F)，之後分別再進行罹病組織分離，結果顯示所得菌株與接種病原菌菌株，其形態特徵皆相同。亦證實 *E. rostratum* 不僅對白花蝴蝶蘭具有病原性外，亦對桃紅色蝴蝶蘭、黃色蝴蝶蘭、黃花文心蘭、嘉得麗雅蘭及白色萬代蘭等不同蘭花具有病原性。

溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將供試的 2 株花瓣斑點病菌之菌絲塊培養於不同溫度之培養箱中，其生長結果如圖 4 所示。於 28℃培養時，病原之生長最為快速，

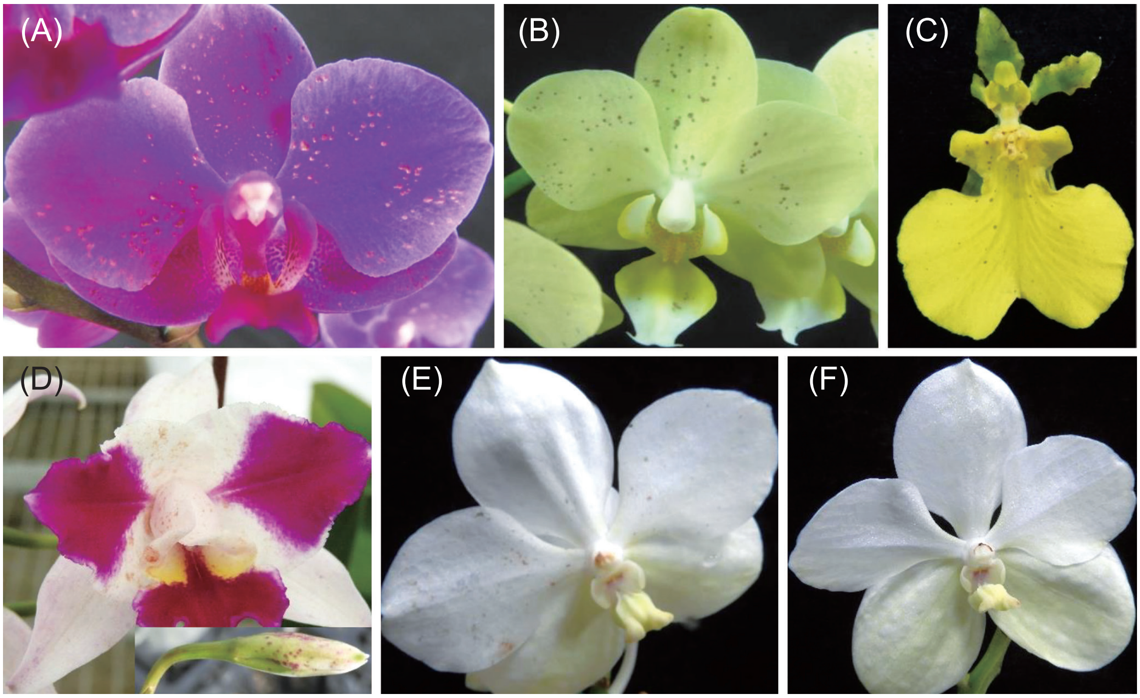

圖 3. 花瓣斑點病菌 (*Exserohilum rostratum* EX001) 分別接種於桃紅蝴蝶蘭 (A)；粉黃蝴蝶蘭 (B)；黃花文心蘭 (檸檬綠) (C)；嘉德麗雅蘭 (D) 及白花萬代蘭 (E)；花朵上 5 d 後之病徵表現，以無菌水接種為對照組 (F：白花萬代蘭)。

Fig. 3. Petal spot symptoms of *Phalaenopsis* Queen Beer 'Mantefon' (A); *Phalaenopsis* Green Pixie 'Ever Green' (B); *Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel' (C); *Cattleya* Chien Ya 'Ocean' (D); and *Vanda* Princess 'Mikasa White' (E); 5 d after inoculation with *Exserohilum rostratum* EX001, and blossom of Vanda inoculated with water as control (F).

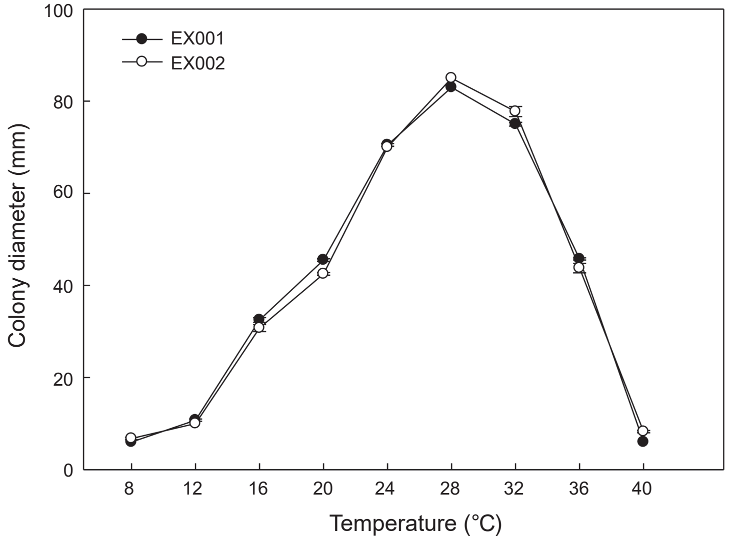

圖 4. 溫度對 *Exserohilum rostratum* EX001 及 EX002 分離株菌絲生長之影響 [potato dextrose agar (PDA) 平板培養 5 d]。

Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Exserohilum rostratum* EX001 and EX002 isolates cultured on potato dextrose agar (PDA) plates for 5 d.

於培養後 5 d 時 EX001 及 EX002 之平均生長直徑分別為 8.3 cm 及 8.5 cm；於 32℃培養時其平均生長直徑為 7.6 cm，於 24℃培養時其平均生長直徑為 7.0 cm，而於 20℃及 36℃培養時其平均生長直徑皆約為 4.5 cm 左右，於 16℃培養時其平均生長直徑約 3.1 cm，於 12℃培養時其平均生長直徑則僅有 1.0 cm 左右，而 8℃及 40℃培養時病原菌幾乎完全不生長。另外，溫度對本菌孢子發芽之影響結果，則如圖 5 所示。在 24–36℃下，於無菌水中 6 h，EX001 及 EX002 菌株之分生孢子發芽率皆達 90% 以上；於 16℃及 20℃時其孢子發芽率介於 73–89% 之間；40℃下 EX001 及 EX002 菌株之孢子發芽率分別為 68.3% 及 73.8%；而

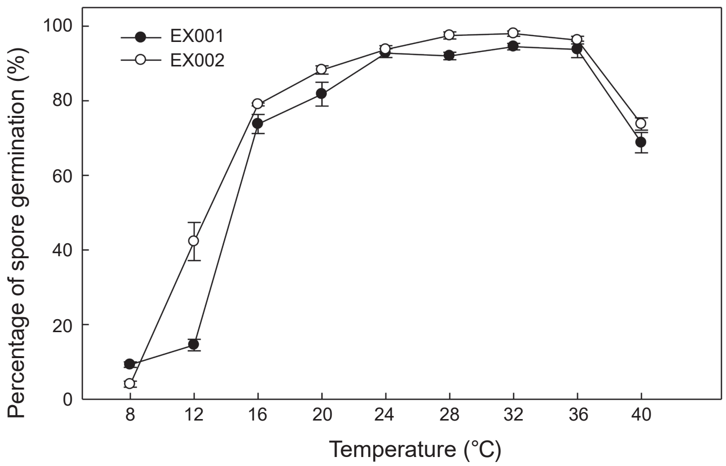

圖 5. 溫度對 *Exserohilum rostratum* EX001 及 EX002 分離株孢子發芽之影響。

Fig. 5. Effect of temperature on spore germination of *Exserohilum rostratum* EX001 and EX002 isolates.

12℃不利孢子發芽，EX001 菌株之發芽率為 14.5%，EX002 菌株則為 42.3%；於 8℃下兩菌株孢子則幾乎不發芽。

藥劑對花瓣斑點病菌菌絲生長之影響

將供試藥劑添加於 PDA 培養基，測試各藥劑對花瓣斑點病菌絲生長之抑制效果，結果如表 1 所示。*E. rostratum* EX001 及 EX002 分離株於 10 mg a.i. L^{-1} 有效成分藥劑濃度下，撲滅寧、依普同、待克利及快得寧對其菌絲生長抑制率皆達 91% 以上。其次為扶吉胺，其對 EX001 及 EX002 菌絲生長之抑制率分別為 84.5% 及 87.8%，而甲基多保淨及波爾多對 EX001 及 EX002 菌絲生長效果差，其抑制率皆為 1% 以下。若有效成分濃度提高至 100 mg a.i. L^{-1} 時，則依普同對 EX001 菌株之菌絲生長抑制率可達到 100%，其次為撲滅寧及待克利的 99.4% 及 99.2%；在 EX002 菌株，則快得寧及待克利之菌絲生長抑制率皆為 100%，而撲滅寧次之，達 97.9% 之生長抑制率。

藥劑對花瓣斑點病菌孢子發芽之影響

測試藥劑對花瓣斑點病菌分生孢子發芽之影響，結果如表 2 所示。EX001 菌株於 10 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度之快得寧及鋅錳乃浦處理下，其分生孢子之發芽率皆為 0，對孢子發芽具有極佳的抑制性；其次，在 10 mg a.i. L^{-1} 氫氧化銅及四氯異苯腈處理下，其孢子發芽率分別為 1.3% 及 6.0%。EX002 菌株於 1 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度之快得寧及鋅錳乃浦處理下，其分生孢子之發芽率為 1–5.5% 之間，對孢子發芽具有極佳的抑制性；而 10 mg a.i. L^{-1} 快得寧、鋅錳乃浦及四氯異苯腈處理下，分生孢子發芽率為 9% 以下；其次，在 10 mg a.i. L^{-1} 氫氧化銅處理下其孢子發芽率為 17.0%。

討論

根據 Anahosur & Sivanesan (1978) 指出，*Exserohilum rostratum* 病原菌之寄主範圍廣，如禾本科植物 (graminicolus)、孤挺花屬 (*Amaryllis*)、木瓜屬 (*Carica*)、香瓜屬 (*Cucumis*)、

表 1. 不同藥劑對 *Exserohilum rostratum* EX001 及 EX002 分離株菌絲生長之影響。

Table 1. Effects of different fungicides on mycelial growth of *Exserohilum rostratum* EX001 and EX002 isolates by culture plate method.

	Inhibition (%)[z]					
	EX001			EX002		
Fungicide	1 mg a.i. L^{-1}	10 mg a.i. L^{-1}	100 mg a.i. L^{-1}	1 mg a.i. L^{-1}	10 mg a.i. L^{-1}	100 mg a.i. L^{-1}
70.0% Thiophanate methyl (WP)[y]	0.0 h[x]	0.8 g	40.3 f	0.0 f	0.0 e	9.7 f
40.0% Oxine-copper (WP)	27.9 f	91.3 b	96.2 b	25.8 d	91.6 bc	100.0 a
50.0% Procymidone (WP)	77.5 c	98.6 a	99.4 a	29.6 d	97.0 ab	97.9 a
53.8% Copper (II) hydroxide (WG)	0.0 h	0.0 g	33.9 g	0.0 f	4.6 e	36.2 d
80.0% Mancozeb (WP)	49.3 e	45.5 e	80.2 d	0.0 f	18.0 d	87.3 c
72.0% Bordeaux mixture (WP)	0.0 h	0.0 g	16.5 i	0.0 f	0.0 e	18.0 e
75.0% Chlorothalonil (WP)	60.9 d	67.2 d	68.5 e	2.1 f	22.0 d	20.7 e
25.0% Difenoconazole (SC)	91.6 a	93.0 b	99.2 a	93.8 a	100.0 a	100.0 a
23.0% Azoxystrobin (SC)	19.7 g	12.5 f	24.9 h	15.0 e	22.6 d	20.1 e
23.7% Iprodione (SC)	76.4 c	97.5 a	100.0 a	57.3 c	94.0 abc	94.7 ab
39.5% Fluazinam (SC)	79.9 b	84.5 c	88.1 c	84.2 b	87.8 c	91.2 bc
LSD (*P* = 0.05)	2.3	3.4	2.1	6.7	6.7	5.9

[z] Inhibition (%) = [(Diameter of mycelial growth on PDA without fungicide – diameter of mycelial growth on PDA with fungicide) / diameter of mycelial growth on PDA without fungicide] × 100%.

[y] WP: wettable powders; WG: water dispersible granules; SC: suspension concentrates.

[x] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by the least significant difference (LSD) test.

表 2. 不同藥劑對 *Exserohilum rostratum* EX001 及 EX002 分離株孢子發芽之影響。

Table 2. Effects of different fungicides on spore germination of *Exserohilum rostratum* EX001 and EX002 isolates by glass slide method.

Fungicide	Spore germination (%)[z] EX001 1 mg a.i. L^{-1}	EX001 10 mg a.i. L^{-1}	EX002 1 mg a.i. L^{-1}	EX002 10 mg a.i. L^{-1}
70.0% Thiophanate methyl (WP)[y]	100.0 a[x]	98.8 a	98.5 a	99.5 a
40.0% Oxine-copper (WP)	0.0 d	0.0 e	1.5 d	0.0 e
50.0% Procymidone (WP)	99.3 a	99.3 a	99.0 a	94.5 b
53.8% Copper (II) hydroxide (WG)	99.5 a	1.3 e	40.2 b	17.0 c
80.0% Mancozeb (WP)	75.5 b	0.0 e	5.5 d	0.5 e
72.0% Bordeaux mixture (WP)	99.8 a	92.3 c	96.8 a	97.8 ab
75.0% Chlorothalonil (WP)	62.8 c	6.0 d	20.0 c	8.7 d
25.0% Difenoconazole (SC)	100.0 a	99.7 a	100.0 a	96.1 ab
23.0% Azoxystrobin (SC)	99.7 a	99.0 a	100.0 a	99.7 a
23.7% Iprodione (SC)	100.0 a	99.8 a	99.5 a	99.5 a
39.5% Fluazinam (SC)	98.3 a	95.0 b	97.5 a	97.8 ab
LSD (P = 0.05)	11.3	2.7	6.7	3.8

[z] Spore germination (%) = (No. of germinated spores/total No. of spores observed) × 100%.
[y] WP: wettable powders; WG: water dispersible granules; SC: suspension concentrates.
[x] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by the least significant difference (LSD) test.

素馨屬 (*Jaminum*)、菸草屬 (*Nicotiana*) 等，包含許多重要經濟作物如玉米、水稻、甘蔗、高粱、番茄及小麥 (Luan *et al*. 2004; Cardona & González 2007; Ahmadpour *et al*. 2013)，亦造成人類疾病發生 (Gauthier & Keller 2013; Sharma *et al*. 2014)。此菌在蘭花上，僅有引起石斛蘭 (*Dendrobium*) 花朵壞疽病斑 (blossom necrotic fleck) (Uchida & Aragaki 1979) 之報導。在台灣，*E. rostratum* 造成玉米葉斑病 (Tsai *et al*. 2001) 及孔雀竹芋 (*Calathea picturata*) 葉枯病 (Chern *et al*. 2011)，但並未見此菌在蘭花上相關報導。然而，本研究於 2017 年從台南某一蘭花園之白花蝴蝶蘭 (*Phal*. Sogo Yukidian 'V3') 罹患褐色斑點病花瓣樣品上，經鏡檢、病組織分離、菌株純化、病原性測定、形態特徵及分子鑑定後，發現是由 *E. rostratum* 引起之花瓣斑點病。另外，因 *Exserohilum* sp. 可直接感染草生植物，造成葉斑及葉片腐爛，爾後藉由風進行傳播至石斛蘭園內，停留在芽及花瓣上。若蘭園區濕度高，則有利該病原菌孢子發芽，造成花瓣上產生病斑，進而影響花卉品質 (Kawate & Sewake 2014)。之後，本研究仍持續監測發生本病害之蘭園及調查其他蝴蝶蘭蘭園，並未發現類似之病害有發生現象。據此，推測本病害為偶發性，本病害發生可能與蘭園管理包含環境衛生、清潔工作等有密切關係。

測定本病原菌之寄主範圍，由接種試驗結果顯示，*E. rostratum* 不僅可危害白花、桃紅花及粉黃花蝴蝶蘭外，亦造成黃花文心蘭 (檸檬綠)、嘉德麗雅蘭及白花萬代蘭花朵上產生斑點病徵。由文獻得知，造成蘭花花朵上出現斑點病徵的病原菌除 *E. rostratum* 之外，尚有 *A. alternata*、*B. setariae*、*B. urochloae*、*B. sorokiniana*、*Bipolaris hawaiiensis*、*Curvularia* sp.、*Stemphylium* sp.、*Phyllostictina* sp.、*Nigrospora* sp. 及 *Pestalotia* sp. 等，均可造成蘭花花瓣上產生黑褐色壞疽斑點 (Blossom necrotic fleck) (Uchida & Aragaki 1979)；而其中的 *B. setariae* 不僅危害蘭花，亦可感染菊花、康乃馨、玫瑰花、天竺葵及金魚草 (Engelhard 1976a, 1976b)。在 Hsieh *et al*. (2000) 報導指出，栽培

於茭白筍田周邊的文心蘭花，會受到茭白筍胡麻葉枯病菌 (*Bipolaris zizaniae*) 危害而引起文心蘭花瓣斑點病。至於台灣地區之蘭花或其他作物之花朵上，是否受到上述病原菌之危害，或病原菌間對寄主是否有交叉感染等問題，仍有待未來持續調查釐清。另外，本研究發現本菌之分生孢子直接噴布於蝴蝶蘭老葉及嫩葉上，均不會造成任何病徵，但只要葉片上有傷口，不論是老葉或嫩葉，均會出現褐色圓形病斑，顯示傷口為本病原菌的感染途徑之一 (資料未顯示)。

本研究另測試溫度對 *E. rostratum* 菌株菌絲生長及孢子發芽之影響，結果發現 24–32℃為本菌菌絲可生長之溫度。其中，又以在 28℃培養下生長較為快速，12℃以下及 40℃之溫度，菌絲幾乎停止生長。另外，發現在 24–36℃無菌水存在 6 h 之情形下，所測試的兩菌株之分生孢子發芽率均可達 90% 以上，而在 20℃及 40℃處理下，分生孢子亦分別有 80% 以上及 65% 以上之發芽率，顯示台灣的溫暖氣候下有利於本病原菌之發芽與侵入感染。根據 Honda & Aragaki (1978) 報告指出，*E. rostratum* 於黑暗培養下，最適產孢溫度為 28–34℃。以目前在台灣蘭園中，蘭花開花期間若遇到低溫高濕環境時須注意灰黴病發生外，於高溫高濕條件下則應注意本病害之發生。

有關蝴蝶蘭花瓣斑點病的防治，目前在國內並無推薦藥劑，本研究選取目前推薦在作物真菌性葉斑病防治之藥劑，測試其對蝴蝶蘭花瓣斑點病菌菌絲生長及孢子發芽之影響。試驗結果顯示，10 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度之快得寧、撲滅寧、待克利及依普同，可有效抑制 *E. rostratum* 菌絲生長，而快得寧、鋅錳乃浦、氫氧化銅及四氯異苯腈可顯著降低病原菌之孢子發芽。值得注意的是，若開花期進行藥劑防治時，應選擇透明無色之藥劑溶液進行噴灑，藥劑施用前，藥液應先行在花朵上測試，可避免於花朵上產生藥斑。

由本研究結果顯示，蝴蝶蘭花瓣斑點病之病原菌 *E. rostratum* 適合於台灣氣候條件下生長及侵染，而所栽種之蘭花品種中有許多亦屬於感病品種，如白花、粉黃花及桃紅蝴蝶蘭、黃花文心蘭、白花萬代蘭及嘉德麗雅蘭等。因此，在蘭花進入開花期時尤應注意氣候變化，並加以預防，避免花卉品質降低。同時應避免於葉片上造成傷口，並加強蘭園區管理包含環境衛生管理及植床、栽培工具清潔等，以降低園區病原菌密度。另外，花期為本病原較易感染時期，若開花期間遇到蘭園內日夜溫度在 25℃以上且又潮濕環境下，應加強藥劑防治，以降低園區病原菌之侵染，以達到防治本病害之目地。

誌謝

本研究承農業試驗所花卉中心戴廷恩主任提供 *Phal*. Sogo Yukidian ‘V3’ 品種植株；黎貴枝小姐、陳家玟小姐、陳姿瑜小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Ahmadpour, A., S. Karami, Z. Heidarian, and M. Javan-Nikkhah. 2013. *Exserohilum rostratum* causing sugarcane leaf spot in Iran. Australas. Plant Dis. Notes 8:97–99.

Anahosur, K. H. and A. Sivanesan. 1978. *Setosphaeria rostrata*. CMI Descr. Pathog. Fungi Bact. 59:587.

Cardona, R. and M. S. González. 2007. First report of *Exserohilum rostratum* associated with rice seed in Venezuela. Plant Dis. 91:226.

Chern, L. L., L. S. Jie, C. T. Feng, and W. C. Ho. 2011. First report of leaf blight on *Calathea picturata* caused by *Exserohilum rostratum* in Taiwan. Plant Dis. 95:1033.

Council of Agriculture, Executive Yuan. 2006. Taiwan native butterfly orchid introduction. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan. https://kmweb.coa.gov.tw/subject/ct.asp?xItem=6742&ctNode=1482&mp=1&kpi=0&hashid= (visit on 6/29/2018) (in Chinese)

Engelhard, A. W. 1976a. Pathogenicity of *Bipolaris* (*Helminalternata thosporium*) *setariae* and *Bipolaris maydis* races T and O to carnation, geranium and snapdragon. Plant Dis. Rep. 60:402–405.

Engelhard, A. W. 1976b. Pathogenicity and conditions for infection of chrysanthemum and rose flowers by *Bipolaris* (*Helminthosporium*) *setariae*. Phytopathology 66:389–391.

Gauthier, G. M. and N. P. Keller. 2013. Crossover fungal pathogens: The biology and pathogenesis of fungi capable of crossing kingdoms to infect plants and humans. Fungal Genet. Biol. 61:146–157.

Honda, Y. and M. Aragaki. 1978. Photosporogenesis in *Exserohilum rostratum*: Temperature effects on sporulation and spore morphology. Mycologia 70:343–354.

Hsieh, T. F., Y. C. Chang, and C. C. Tu. 2000. Petal spot of *Oncidium* hybridium caused by *Bipolaria zianiae*. Plant Pathol. Bull. 9:75–78. (in Chinese with English abstract)

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

Kawate, M. and K. T. Sewake. 2014. Pest management strategic plan for potted orchid production in Hawaii. University of Hawai‘i at Mānoa, Honolulu, HI. https://ipmdata.ipmcenters.org/documents/pmsps/HI_orchid_PMSP.pdf (visit on 4/12/2018)

Kusai, N. A., M. M. Z. Azmi, N. A. I. M. Zainudin, M. T. Yusof, and A. A. Razak. 2016. Morphological and molecular characterization, sexual reproduction, and pathogenicity of *Setosphaeria rostrata* isolates from rice leaf spot. Mycologia 108:905–914.

Leonard, K. L. and E. G. Suggs. 1974. *Setosphaeria prolata*, the ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. Mycologia 66:281–297.

Leonard, K. J. 1976. Synonymy of exserohilum halodes with *E. Rostratum*, and induction of the ascigerous state, *Setosphaeria rostrata*. Mycologia 68:402–411.

Liu, Y. X., Y. P. Shi, and Z. Y. Cai. 2016. A first report of rubber tree leaf spot caused by *Exserohilum rostratum* in China. Plant Dis. 100:2167.

Luan, F. G., S. Qiang, D. Y. Ma, and Riziwangguli. 2004. The primary studies on isolation and identification of wheat black embryo in Xinjiang. Xinjiang Agric. Sci. 41:357–360. (in Chinese with English abstract)

Majeed, R. A., A. A. Shahid, G. A. Liaqat, K. Saleem, M. Asif, M. Shafiq, M. S. Haider, and M. Noreen. 2016. First report of *Setosphaeria rostrata* causing brown leaf spot of rice in Pakistan. Plant Dis. 100:2162.

Sharma, K., E. M. Goss, E. R. Dickstein, M. E. Smith, J. A. Johnson, F. S. Southwick, and A. H. C. van Bruggen. 2014. *Exserohilum rostratum*: Characterization of a cross-kingdom pathogen of plants and humans. PLOS One 9:e108691.

Taiwan Orchid Growers Association. 2018. *Phalaenopsis*. Taiwan Orchid Growers Association, Tainan, Taiwan. https://www.toga.org.tw/info/1/8 (visit on 6/29/2018) (in Chinese)

Tsai, J. N., W. H. Tsai, and J. L. Chen. 2001. Pathogenicity of *Exserohilum rostratum* on corn and weeds in the corn fields. Plant Pathol. Bull. 10:181–186. (in Chinese with English abstract)

Uchida, J. Y. and M. Aragaki. 1979. Etiology of necrotic flecks on *Dendrobium* blossoms. Phytopathology 69:1115–1117.

Uchida, J. Y. and M. Aragaki. 1991. Fungal Diseases of *Dendrobium* Flowers. University of Hawaii. Honolulu, HI. 7 pp.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp.

Zhang, W., J. X. Liu, P. H. Huo, and T. Zhang. 2016. *Exserohilum rostratum* causes a leaf spot on hybrid bermudagrass (*Cynodon dactylon* × *C. transvaalensis*) in China. Plant Dis. 100:1504.

Petal Spot of Phalaenopsis Caused by *Exserohilum rostratum*

Chiao-Wen Huang[1], Jin-Hsing Huang[2], Jhih-Nung Tsai[2], Li-Hsiang Chung[3], and Ting-Fang Hsieh[4,*]

Abstract

Huang, C. W., J. H. Huang, J. N. Tsai, L. H. Chung, and T. F. Hsieh. 2019. Petal spot of Phalaenopsis caused by *Exserohilum rostratum*. J. Taiwan Agric. Res. 68(1):47–58.

In April 2017, flower diseases of Phalaenopsis (Sogo Yukidian 'V3') occurred in Tainan area with the symptoms showed brown small spots on petal, sometimes sunken, and about 1 mm or less in diameter without expanding. It seriously affected quality of ornamental flowers and cut flowers. The pathogen isolated from the diseased tissue produced dark grey mycelium on potato dextrose agar (PDA). Conidium is ellipsoidal to fusiform, dark brown, and with hilum. The causative fungus was identified as *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs based on symptoms, morphological characteristics and ITS rDNA sequence. The pathogen not only harmed the white flowers of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3', but also caused symptoms on the petals of *Phalaenopsis* Queen Beer 'Mantefon', *Phalaenopsis* Green Pixie 'Ever Green', *Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel', *Cattleya* Chien Ya 'Ocean' and *Vanda* Princess 'Mikasa White'. The optimal temperature was 28℃ for mycelial growth of *Exserohilum rostratum* and 24–36℃ for spore germination. Mycelial growth of the pathogen was effectively inhibited more than 90% by oxine-copper, procymidone, difenoconazole and Iprodione with the concentration at 10 mg a.i. L^{-1}. Spore germination of pathogen was inhibited by oxine-copper, copper (II) hydroxide, mancozeb and chlorothalonil with the concentration at 10 mg a.i. L^{-1}. This is the first report of Phalaenopsis petal spot disease caused by *E. rostratum* in Taiwan.

Key words: Phalaenopsis, Petal spot, Fungicide screening.

Received: June 20, 2018; Accepted: September 19, 2018.

[*] Corresponding author, e-mail: TFHsieh@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Research Fellow and Director, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(1):59–68 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201903_68(1).0006

研究報告

評估使用定量 PCR 技術鑑定香蕉萎縮病毒

關政平 [1,*] 張溢麟 [2] 曾清山 [3] 楊佐琦 [4]

摘要

關政平、張溢麟、曾清山、楊佐琦。2019。評估使用定量 PCR 技術鑑定香蕉萎縮病毒。台灣農業研究 68(1):59–68。

香蕉萎縮病毒 (*Banana bunchy top virus*; BBTV) 為一種危害香蕉之病原，它的偵測與確認已是台灣香蕉產區及世界重要課題。本研究使用即時螢光定量 polymerase chain reaction (PCR) 技術，應用於鑑定香蕉感染 BBTV 與否之檢測。本技術發展之即時螢光定量 PCR 技術，同時利用含有 BBTV-CP 基因之引子和探針，以 real-time PCR (qPCR) 法與 TaqMan® 螢光探針鑑定 BBTV 外，並區分香蕉其他病毒 (香蕉條斑病毒及胡瓜嵌紋病毒)，且不與健康組織有反應。本技術將可應用在植株感染病毒早期檢測、篩選抗 BBTV 之香蕉品系、田間植株病害檢測之判定，以及作為健康香蕉種苗生產與驗證。

關鍵詞：香蕉萎縮病、BBTV、偵測。

前言

香蕉萎縮病 (Bunchy top disease of banana) 為目前全球最嚴重的香蕉病毒病害，此病也是台灣普遍具破壞性之香蕉病毒病害，並曾在中部造成數度大流行，幾乎造成台蕉主要栽培品種「北蕉」的滅絕，對台灣香蕉產業形成相當的威脅 (Sun 1961; Tsai *et al*. 1986)。香蕉萎縮病毒 (*Banana bunchy top virus*; BBTV) 之病毒顆粒外觀為二十面體的球型，含多粒病毒體 (6–8)，攜帶有環型 ssDNA (circular single-stranded DNA)，直徑 18–20 nm (Burns *et al*. 1994; Harding *et al*. 1991; Vetten *et al*. 2005)。最早發現香蕉萎縮病發生在 1889 年的斐濟，國際上目前已知香蕉萎縮病分布有非洲、大洋洲，亞洲包括台灣、日本琉球、中國大陸、菲律賓等 (Wardlaw 1961; Manser 1982; Dale 1987; Kawano & Su 1993; Kenyon *et al*. 1997)，香蕉萎縮病常造成栽種國嚴重的經濟損失。台灣中部曾發生大流行，平均園區發病率達 16.4%，嚴重罹病地區有超過 50% 以上發病率 (Sun 1961)。香蕉萎縮病主要的傳播媒介為蕉蚜 (*Pentalonia nigronervosa*) (Hu *et al*. 1996)。

為了鑑別植株健康狀況，目前香蕉萎縮病植株的檢測常見方法有 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 (Wu & Su 1990)、polymerase chain reaction (PCR) 及即時螢光定量 PCR (real-time PCR; qPCR) 法 (Xie & Hu 1995; Chen & Hu 2013) 等。本研究目的在於發展檢測萎縮病毒之定量核酸擴增技術，分析植株中萎縮病毒含量，並利用香蕉 UBQ 基因檢測作為內控，未來將應用在香蕉不同品系抗病之鑑定工具。

材料與方法

香蕉材料、病毒來源及接種

本研究使用香蕉品種為「新北蕉」，蕉苗

投稿日期：2018 年 2 月 13 日；接受日期：2018 年 10 月 1 日。
* 通訊作者：pcr123@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組替代役。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

購自台灣香蕉研究所，小苗或吸芽經無菌處理與組織培養繼代繁殖後。挑選苗齡約 1 mo，瓶苗大小一致，培養於 B3 固態培養基 (1/2 MS salt, 340 mg L^{-1} $NaH_2PO_4 \cdot O_2O$, 160 mg L^{-1} adenine sulfate, 3% sucrose, pH 5.5, 0.7% agar)，於 25℃、12 h 光照環境下培養。待小植株發根後出瓶，定植於 3 吋盆放置溫室馴化。至 5 wk 後，蕉苗生長至株高約 10 cm 左右，4–5 片幼葉時，選取株高一致且葉數接近的小苗進行接種試驗。

BBTV、香蕉條斑病毒 (*Banana streak virus*; BSV) 及胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV)，病毒分離株採自霧峰地區香蕉園。其中，BBTV 以健康蕉蚜餵食病株香蕉後，接種至「新北蕉」幼苗至發病，各病毒株皆經 PCR 分析鑑定，PCR 產物皆經由核酸定序確認是否感染病毒，並鑑別病毒種類。植物基因體 DNA 的萃取，是使用 Plant Genomic DNA Purification Kit (Protech, Taipei, Taiwan)，萃取方法依原廠手冊建議。將香蕉幼苗移植至栽培介質中，培養於溫室 (溫度 25–28℃)。本試驗作為接種使用之蕉蚜 (*P. nigronervosa*) 取自行政院農委會農業試驗所生物技術組隔離田間，首先利用 PCR 檢測蕉蚜體內的帶毒情況，將蕉蚜移置健康的香蕉幼苗飼養繁殖。確認飼養的蕉蚜族群為無帶毒個體，飼養在生物技術組之半密閉溫室網室中，保持族群數量以供接種試驗使用。本研究使用「新北蕉」進行接種條件試驗，首先將繁殖無帶毒的蕉蚜放置帶有 BBTV 罹病植株，讓蕉蚜吸取病毒 48 h，再經 PCR 檢測蕉蚜體內帶毒情形，將成熟蕉蚜接種到健康蕉苗。分別試驗條件有接種蕉蚜數量、接種傳毒時間及接種蕉苗株高。進行接種後定期觀察 2 mo 植株病徵，並以 PCR 法及 real-time PCR 法檢測。

香蕉總量 DNA 之純化

將植物組織以 MasterPure DNA 純化套組 (Epicentre, Madison, WI, USA) 萃取總體 DNA，參照純化套組所附萃取步驟。先秤取 1 mg 植物組織，使用液態氮急速冷凍並研磨成粉末狀，研磨完的均質組織粉末與 300 µL Tissue and Cell Lysis Solution 在 1.5 mL 微量離心管中均勻混合。置於 65℃下放置 15 min，每 5 min 震盪 1 次。接著放置室溫冷卻後，加入 1 µL 5 µg μL^{-1} RNase A 於 37℃反應 30 min。將均質樣品加入 150 µL MPC Protein Precipitation Reagent 震盪 10 s，接著以 ≥ 10,000× *g* 離心 10 min，吸取上層澄清液至新的微量離心管中。加入 500 µL Isopropanol，上下倒置混合 40 次後，於 4 ℃ 下 ≥ 10,000× *g* 離心 10 min。移除上清液，加入 75% 酒精，以震盪器震盪 DNA 沉澱物。再於 4℃下 ≥ 10,000× *g* 離心，移除上清液後，重複 1 次。確認完全移除酒精後，加入 35 µL TE buffer 回溶沉澱物。

引子設計

由 GenBank 資料庫中搜尋台灣地區的 BBTV 分離株，經由 ClustalW2 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) 比對序列之高保留區域，設計引子藉由 Primer Express^{TM} (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) 軟體設計，核酸引子合成則是委託 Bio Basic 公司 (Bio Basic Inc, Markham, Canana) 所合成 (序列詳如表 1)。即時螢光定量所使用的螢光探針，來自 Biosearch Technologies (Petaluma, CA, USA)。螢光探針序列可專一性結合於 BBTV DNA-S 的 coat protein 基因序列，探針的 5’ 端標定 TAMRA (Carboxytetramethyl-rhodamine)，其 3’ 端標定 BHQ-2 (Black hole quencher-2)，藉由 PCR 每循環一次就有 1 次螢光信號釋放，利用儀器偵測反應後產物總量。

PCR

根據上述設計之引子進行 PCR，PCR 反應試劑為 ProTaq^{TM} Plus 反應套組 (Protech, Taipei, Taiwan)，以 BBTV-M-526F 和 BBTV-M-526R 引子進行 PCR 反應，反應條件為：95℃ 3 min、40 個循環，95℃ 30 s、55℃ 30 s 和 72℃ 30 s。之後，72℃ 5 min 和 16℃定溫，將所擴增的片段選殖於載體 pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA)，並轉型於 *Escherichia coli* JM 109 (Promega, Madison, WI, USA)，以構築 BBTV DNA-S 之 plasmid DNA 當作模板。以 5 ng plasmid DNA 或植物 DNA 為模板，在

表 1. 本試驗所使用之引子與核酸探針。

Table 1. The primers and probes used in these study.

Target	Accession number	Name (primer probe^{-1})	Sequence 5' to 3'	Nucleotide position	Amplicon size (bp)	Modification
BBTV DNA-S	EU366171	BBTV-M-526F	gaaatcaaccagccgactaca	497–517	526	
		BBTV-M-526R	ctggcccaccactaaagtggtgg	1023–1035	526	
		BBTV-Q-82F	ggcaacaagccacgacta	310–327	82	
		BBTV-Q-82R	cagtaggctcaatcctaaatacc	370–392	82	
		BBTV probe	tcgtcgttaggatcaatattggttcc	329–354		5'-TAMRA[z]; 3'-BHQ2[y]
Musa acuminate UBQ2	HQ853254				316	
					316	
		UBQ2-Q-84F	gctccgacgcatgtatgaaac	1298–1319	84	
		UBQ2-Q-84R	ggaacccacattaccacctaagtct	1358–1383	84	
		UBQ2 probe	tcaggagccattctttaatgcagca	1323–1347		5'-FAM; 3'-BHQ1

[z] TAMRA: The 5-end of probe was labeled with 6-carboxytetamethyl-rhodamine.
[y] BHQ2: The 3-end of probe was labeled with Black Hole-2 quencher dye.

總體積 25 µL 反應溶液中進行 PCR，其溶液中含有 2.5 µL 10× PCR buffer、2 µL 2.5 µM dNTP、2 µL 10µM 引子、0.5 µL ProTaq DNA polymerase。反應條件為 94℃ 3 min，95℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 40 s，共 35 個循環；最後再以 72℃反應 6 min。PCR 機器為 Veriti Thermal Cycle (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)，取 5 µL PCR 產物進行 2% 膠體電泳，以 Ethidium bromide (EB) 染色後，於 Ultraviolet (UV) 光照相並分析結果。

即時螢光定量 PCR

Real-time PCR 反應試劑為 KAPA probe fast qPCR 反應套組 (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA)，使用引子對為 BBTV-Q-82F/R 與 UBQ2-Q84F/R，使用探針為 BBTV probe (BBTV-p) 和 UBQ2 probe (UBQ2-p)。於 0.2 mL 微量離心管中加入 5 ng plasmid DNA、植物 DNA 為模板，2× KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix 10 µL、10 µM 引子 1 µL、探針 1 µL，總體積 20 µL，進行 PCR 反應。反應條件為 94℃ 3 min；95℃ 3 s、60℃ 0 s，共 40 個循環。Real-time PCR 機器為 ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)，threshold 或 baseline 參數的設定採用系統自動判讀方式。

偵測 BBTV 靈敏度試驗

為分析本偵測技術所設計之探針序列之靈敏度，以 BBTV-Q-82F/R 與 UBQ2-M316F/R 引子對，以及 BBTV probe 和 UBQ2 probe 探針進行 PCR 反應。反應條件為：95℃ 3 min、40 個循環的 95℃ 30 s、55℃ 30 s 和 72℃ 30 s，72℃ 5 min 和 16℃定溫，將 plasmid DNA 進行 10× 序列稀釋後，利用傳統 PCR 及 real-time PCR 進行試驗。將 BBTV DNA-S plasmid DNA 稀釋濃度從 1.14×10^9 BBTV 基因 copy 數至 1.14×10^0 BBTV 基因 copy 數之負對數值 (-log) 與 real-time PCR 反應後所測得相對應 Ct 值，製作標準曲線圖；即橫座標為總量 DNA 濃度之負對數值，縱座標為 Ct 值，點代表由 3 次獨立試驗所得的平均 Ct 值，線代表為 DNA 濃度與 Ct 值對應之線性回歸分析。

香蕉組織中 BBTV 之定量分析

測定 BBTV 在香蕉組織中分布之情形，將接種 BBTV 後確認罹病蕉苗，經持續培養 2 mo 後，取罹病之蕉苗的不同部位分別為新葉 (上位)、葉 (下位)、上假莖、下假莖及根，進行總量 DNA 萃取。調整樣品之總量 DNA 濃度為 5 ng，以 real-time PCR 進行定量分析，每反應 3 重複。

田間 BBTV 檢測

採集田間栽培之香蕉材料，取新葉組織約 10 mg 利用 MasterPure DNA 純化套組 (Epicentre, Madison, WI, USA) 萃取總量 DNA。步驟依照前述材料與方法進行，將純化得到之 DNA 進行 PCR 法及 real-time PCR 法檢測。

結果

BBTV 專一性試驗

本試驗比對台灣 BBTV 病毒株具高度保留區序列 (圖 1)，設計引子對與探針如表 1 所述。為測試本試驗發展 qPCR 對 BBTV 是否具專一性，使用 qPCR 法增幅感染 BBTV 之香蕉植株組織的核酸萃取物，同時以傳統 PCR 做比較。傳統 PCR 產生 526 bp 之 BBTV 專一性核酸片段產物，由瓊脂凝膠電泳分析，確認其產物大小符合預期大小；經瓊脂凝膠電泳分析結果顯示，僅 BBTV 質體 DNA 及 BBTV 感染之香蕉組織 DNA 出現 526 bp 產物片段，對於 CMV cDNA、BSV 感染之香蕉及健康香蕉皆無反應 (圖 2A)。qPCR 法檢測 BBTV 感染之香蕉組織 DNA，經 qPCR 分析結果，僅 BBTV 質體 DNA 及 BBTV 感染之香蕉組織 DNA 出現訊號，對於 CMV cDNA、BSV 感染之香蕉及健康香蕉皆無反應 (圖 2B)。由上述試驗，確認本研究所設計引子，在傳統 PCR 及 qPCR 法對 BBTV 具有高度專一性。

BBTV 靈敏度試驗

利用 BBTV 質體 DNA 作為試驗用之核酸模板，核酸濃度由 5 ng 起始經系列 10× 稀釋後，利用 PCR 及 qPCR 法進行分析，比較兩

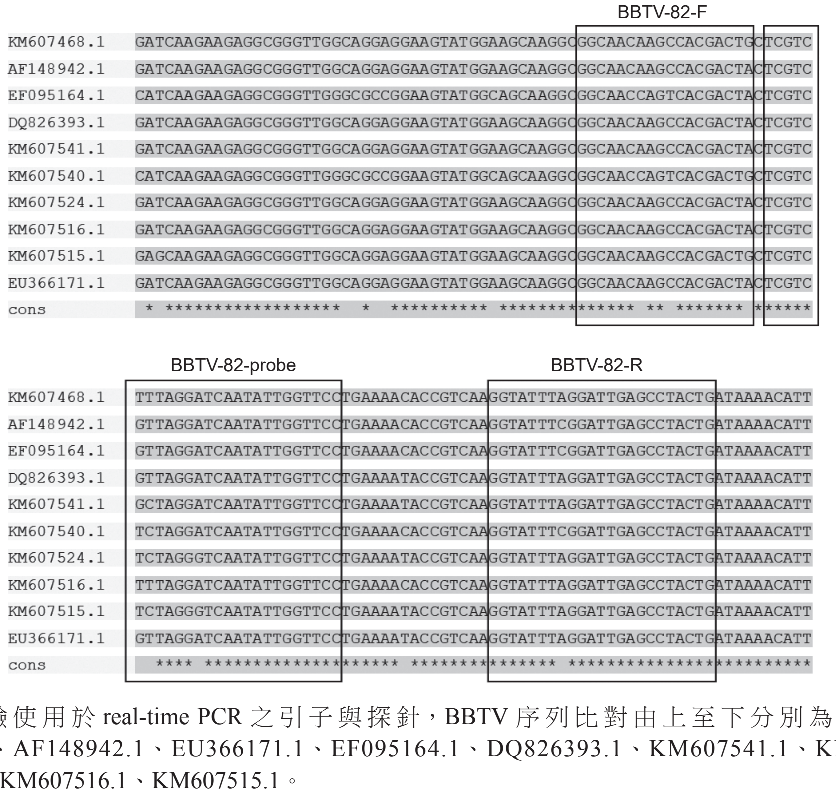

圖 1. 本試驗使用於 real-time PCR 之引子與探針，BBTV 序列比對由上至下分別為 Accesion no. KM607468.1、AF148942.1、EU366171.1、EF095164.1、DQ826393.1、KM607541.1、KM607540.1、KM607524.1、KM607516.1、KM607515.1。

Fig. 1. Sequence alignment of the BBTV CP partial protein gene regions showing the locations of the primers and probes used for qPCR amplification. Accession numbers for the aligned isolates (top to bottom) are KM607468.1, AF148942.1, EU366171.1, EF095164.1, DQ826393.1, KM607541.1, KM607540.1, KM607524.1, KM607516.1, and KM607515.1.

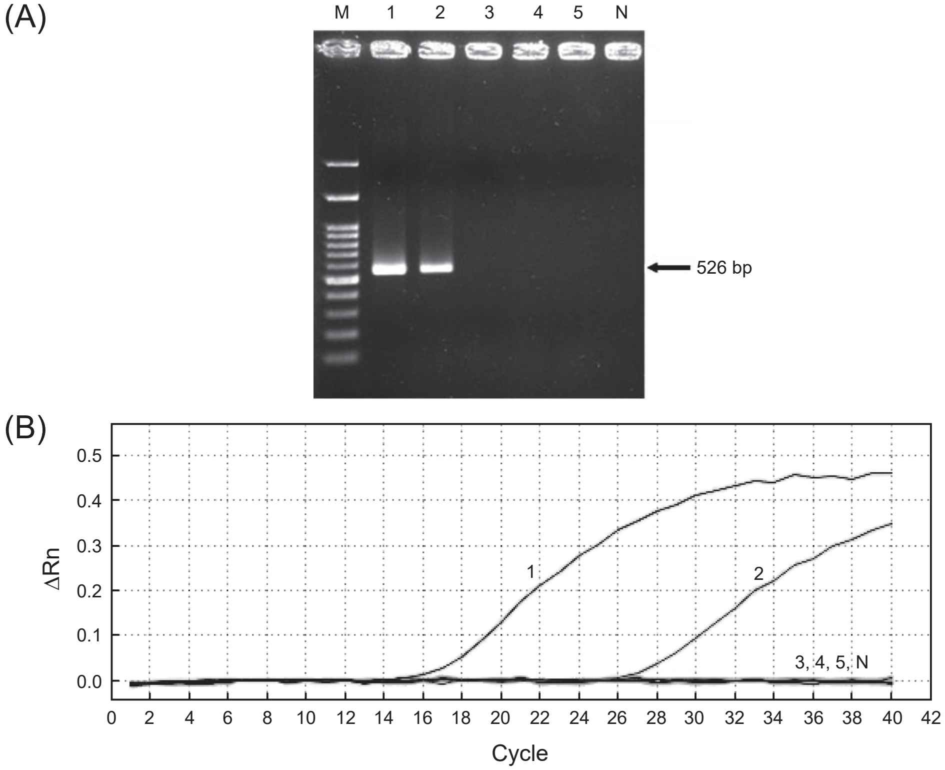

圖 2. 使用 polymerase chain reaction (PCR) (A) 和 real-time PCR (B) 偵測 *Banana bunchy top virus* (BBTV) 之專一性試驗。1：BBTV 質體 DNA；2：感染 BBTV 香蕉葉組織；3：感染 *Banana streak virus* (BSV) 香蕉葉組織；4：Cytomegalovirus (CMV) cDNA；5：健康香蕉；N：無核酸模板對照組 (no template control; NTC)；M：100 bp DNA ladder。

Fig. 2. Specificity test of polymerase chain reaction (PCR) (A) and real-time PCR (B) for detection of *Banana bunchy top virus* (BBTV). Lane M: 100 bp DNA ladder; lane 1: cloned BBTV DNA-S plasmid DNA; lane 2: BBTV-infected banana leaf tissue; lane 3: BSV-infected banana leaf tissue; lane 4: Cytomegalovirus (CMV) cDNA; and lane 5: healthy banana; and lane N: no template control.

種檢測法之靈敏度差異。結果顯示，傳統 PCR 法經瓊脂凝膠電泳分析，增幅出 526 bp 之 BBTV 專一性核酸片段，可被偵測的最低濃度為 1.14×10^3 BBTV CP 基因 copy 數。而根據 qPCR 分析結果，可被偵測的最低濃度為 1.14 copy 數 (圖 3A–3B)。經由上述結果顯示，在檢測 BBTV 靈敏度上，real-time RT-PCR 可檢測最低病毒濃度到 1.14 BBTV CP 基因 copy 數，使用 PCR 則可檢測之最低病毒 DNA 濃度為 1.14×10^3 BBTV CP 基因 copy 數。由上述結果顯示，利用 qPCR 法檢測 BBTV 質體 DNA 之靈敏度，高於傳統 PCR 法達 1,000 倍。將 qPCR 法所測得之結果繪製標準曲線，縱座標為 Ct 值，橫座標為 BBTV 質體 DNA 濃度的負對數值 (-log)，得到標準曲線方程式為 $Y = -3.1097X + 39.424$，$R^2 = 0.9959$ (圖 3C)，$E = 95.9\%$。上述試驗結果，可應用於定量病毒含量。

香蕉不同組織帶毒量試驗

本研究接種時間及接種植株高度試驗，皆使用約 2 mo 大的組織蕉苗，高度在 10 cm 左右，據此同樣接種 5 隻蚜蟲之罹病率達 80% (未列於結果)。後續試驗，也以此香蕉植株大小作為接種測試帶病毒情形。為瞭解香蕉感染 BBTV 時病毒在植株體內的分布狀況，本試驗將罹病之香蕉植株的根、上位及下位假莖、新葉帶有病徵葉及無病徵葉個別採樣，

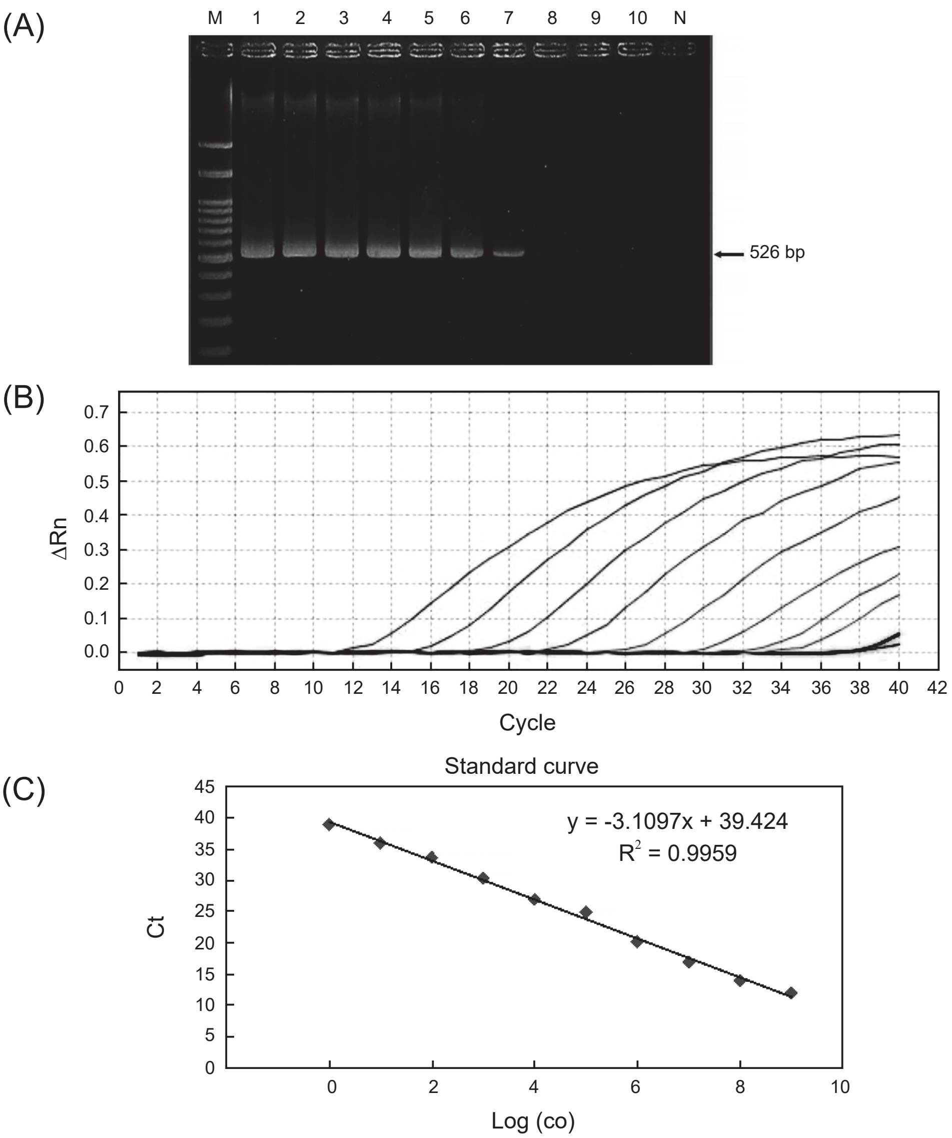

圖3. 利用polymerase chain reaction (PCR) (A) 和real-time PCR (B, C) 方法檢測*Banana bunchy top virus* (BBTV)的靈敏度試驗。(A) PCR 的試驗結果，1–10 為 BBTV DNA-S 質體 DNA 連續 10× 系列稀釋 (1.14×10^9–1.14×10^0 copy no.)；N：無核酸模板對照組 (no template control; NTC)，M：100 bp DNA ladder；(B) real-time PCR 的試驗結果，為 BBTV DNA-3 質體 DNA 連續 10× 系列稀釋 (1.14×10^9 copy no–1.14×10^0 copy no.)；(C) real-time PCR 試驗結果的標準曲線；縱軸：Ct 值；水平軸：BBTV 質體 DNA 序列稀釋 log copy number 值。

Fig. 3. Sensitivity test of polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR for detection of *Banana bunchy top virus* (BBTV). (A) Amplification of 10-fold serial dilutions of BBTV plasmid DNA (1.14×10^9 to 1.14×10^0 copy no.) by the PCR and analyzed by gel. Lane M: 100 bp DNA ladder; lane N: no template control. (B) Amplification plot of 10-fold serial dilutions of BBTV plasmid DNA (1.14×10^9 to 1.14×10^0 copy no.) by the real-time PCR. (C) The standard cure of 10-fold serial dilutions of BBTV DNA. The regression equation is Ct = -3.1097 × log (no. of virus copy) + 39.424.

萃取其總核酸後做為模板。以 qPCR 法進行分析，將分析所測到的 Ct 數據，帶入由靈敏度試驗繪製而成的標準曲線公式，演算得知各部位之 BBTV copy number (copy no.)，分別為葉 1.63 ×

10^5 copy no.、根 1.00×10^1 copy no.、上假莖 2.20×10^5 copy no.、下假莖 1.72×10^6 copy no. (表 2)。使用 PCR 檢測，葉、下位假莖及上位假莖皆可測出，但根無法檢測到 BBTV (表 2)。

田間病毒檢測試驗

利用傳統 PCR 及 qPCR 法檢測田間疑似感染 BBTV 之香蕉樣品，採樣共採得 20 株田間香蕉葉片，萃取總核酸後進行 PCR 分析。分析結果，傳統 PCR 法測得 7 株具有 BBTV，而 qPCR 法亦測得 9 株具有 BBTV 感染，使用 PCR 檢出率為 35%；使用 qPCR 檢出率為 45% 檢出 BBTV (表 3)。顯示 PCR 及 qPCR 法，皆可用於檢測田間受 BBTV 感染之香蕉植株，但 qPCR 較為靈敏。

討論

香蕉屬於熱帶果樹，幾乎所有種植香蕉的國家都有發生香蕉萎縮病 (Burns 1994)。香蕉萎縮病毒屬於系統性病害，亦為台灣常見的香蕉病毒之一，早期曾發生過大規模感染，導致產量與經濟之損失。此病之傳播方式，主要經由罹病香蕉母株之無性繁殖體之吸芽或經由組織培養苗傳播。另一方式是經由媒介昆蟲蕉蚜在田間做短、長距離的傳播，因而造成 BBTV 蔓延擴散流行於田間。目前防治方法，主要為保持香蕉田間衛生，避免病毒媒介蚜蟲大量滋生，利用組織培養繁殖無病毒的健康香蕉種苗，得以暫時控制病害蔓延。為了生產健康種苗及發展篩選抗 BBTV 香蕉之相關研究，本試驗開發一套 BBTV 接種流程及 BBTV 專一性且靈敏度高的檢測技術，作為協助往後抗 BBTV 香蕉品系之篩選及培育無病毒之健康香蕉組培苗。

現今 BBTV 常用之檢測技術除血清學法外，多應用核酸方式鑑定，早在 1995 年傳統 PCR 法已被發展 (Xie & Hu 1995)。而近期即時螢光定量 PCR 法，亦被報導於檢測此病毒 (Chen & Hu 2013)。Chen & Hu (2013) 開發之即時螢光定量 PCR 法，所選擇的 BBTV 序列為 CP 基因，所設計的產物預期大小為 155 bp。為能正確鑑定台灣 BBTV 感染香蕉，本研究所設計的基因序列皆來自台灣，同樣選擇 CP 基因具高度保留序列，所設計的產物預期大小為 82 bp，二者所選用的檢測基因標的區域近似相關。由結果顯示，本法即時螢光定量 PCR 法可正確檢測感染之 BBTV，包括本研究室之 3 個 BBTV 分離株 (結果未呈現)，而不與健康香蕉植株反應。Chen & Hu (2013) 檢測 BBTV 最低需要的病葉，萃取香蕉組織需要 1 mg–1 ng 量，本試驗所需要的萃取香蕉組織量則約 1 mg，二者相當。由本研究顯示，即時螢光定量的靈敏度較一般 PCR 靈敏度提高約 1,000×。但 Chen & Hu (2013) 的試驗顯示，PCR 與即時螢光定量的稀釋終點靈敏度皆達 10^7 稀釋倍率，認為其 PCR 試劑有添加 bovine serum albumin (BSA, 1%) 與 polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40, 20%)，可減少 PCR 干擾物的產生，故能有效提升 PCR 的反應效率，與 real-time PCR 的靈敏度相當。推測對於粗萃核酸之香蕉樣本，可能含有植物細胞中的多酚等物質，PVP-40 的添加極有可能抑制 PCR 之干擾作用，幫助提升 PCR 及 qPCR 反應的效率。同時 ELISA 法的靈敏度稀釋終點為 10^2

表 2. 感病香蕉植株不同部位之 *Banana bunchy top virus* (BBTV) 檢測。

Table 2. Detection and quantification of *Banana bunchy top virus* (BBTV) using PCR and qPCR from tissues of different part of BBTV-infected bananas.

Various part	PCR	qPCR	Number of copy BBTV[z]
Leaf	+	+	1.63×10^6
Root	−	+	1.00×10^2
Pseudostem (upper)	+	+	2.20×10^6
Pseudostem (lower)	+	+	1.72×10^7

[z] BBTV copy number was estimated from the dilution curve. qPCR: real-time PCR. PCR: polymerase chain reaction.

表 3. 比較 real-time polymerase chain reaction (PCR) 和 PCR 檢測田間香蕉「北蕉」的 *Banana bunchy top virus* (BBTV) 感染結果。

Table 3. Detection of *Banana bunchy top virus* (BBTV) by real-time polymerase chain reaction (PCR) and PCR for naturally infected field banana plants.

Field sample[z]	PCR[y]	Real-time PCR (Ct)[x]
A1	−	−
A2	−	−
A3	−	−
A4	−	−
A5	−	−
P1	+	+ (24.56)
P2	+	+ (21.74)
P3	−	+ (35.92)
P4	−	−
P5	−	−
R1	−	+ (34.01)
R2	−	−
R3	+	+ (26.98)
R4	−	−
X1	−	−
X2	−	−
X3	+	+ (20.26)
X4	+	+ (21.55)
X5	+	+ (22.00)
X6	+	+ (19.74)
BBTV	+	+
HE	−	−
NTC	−	−

[z] HE: healthy banana; NTC: no template control; BBTV: BBTV cloned plasmid.
[y] PCR results: + indicates a clearly visible band in gel electrophoresis; − indicates a negative reaction.
[x] Ct threshold values represent the mean Ct obtained after running samples in triplicate. Ct values below 35 are considered to be clearly positive results.

稀釋倍數，Chen & Hu (2013) 之即時螢光定量 PCR 法可檢測出感染植物樣品，較 ELISA 法靈敏度高 10,000×，因此也確認 real-time PCR 檢測 BBTV 之靈敏度較 ELISA 為高。由 qPCR 之靈敏度試驗顯示，本試驗的最低病毒 DNA 量可檢測達 1.14 copy no.，而 Chen & Hu (2013) 的試驗結果為 2.76 copy no.，可偵測的最低值相近，而本試驗結果較優。

本研究試驗 BBTV 接種流程，開發 BBTV 接種方法之建立。首先試驗蚜蟲之接種數量，蚜蟲使用數量條件分別為 5 隻及 10 隻，接種後之植株萃取總核酸進行 BBTV 檢測。經 PCR 與瓊脂凝膠電泳分析結果顯示，發現利用 5 隻蚜蟲傳遞病毒並無法達到 100% 罹病率。雖然起初蚜蟲隻數試驗得知 5 隻蚜蟲即可順利傳毒，但此試驗受測植株高度小於 5 cm。另有研究指出，接種 1 mo 大的組織培養蕉苗，5 隻蚜蟲即可達到 100% (Wu 1987)，此與本試驗結果相符。然而本研究接種時間及接種植株高度試驗皆使用約 2 mo，大的組織蕉苗，高度在 10 cm 左右，因此同樣接種 5 隻蚜蟲之罹病率達 80%，並無法達到 100% (未列於結果)。

此外，在試驗接種條件過程，利用傳統 PCR 及 qPCR 法一併檢測接種後不同時期 BBTV 核酸含量，結果發現傳統 PCR 及 qPCR 法皆比外觀病徵觀察更早得知感染 BBTV。此提早檢測出 BBTV 病毒之優點，可應用在早期偵測抗病組織培養蕉苗之篩選。田間檢測部分，由感病香蕉之不同部位進行檢測，顯示除根部外、假莖包含上位與下位部、有病徵新葉、無病徵葉皆可由 qPCR 檢測出，但使用 PCR 法則無法測出根部及下位老葉之 BBTV。

田間病毒檢測試驗顯示，田間香蕉葉片使用 PCR 檢出率為 35%；使用 qPCR 檢出率為 45%。顯示 PCR 及 qPCR 法皆可用於檢測田間受 BBTV 感染之香蕉植株，但傳統 PCR 法測得 7 株具有 BBTV，而 qPCR 法亦測得 9 株具有 BBTV 感染，故 qPCR 較為靈敏。此結果與 Kumar *et al*. (2011) 的研究報告稱香蕉萎縮病在田間感染率一般在 20–100% 的發生相當，但有 2 株僅由 qPCR 被檢出，一般 PCR 無法測出可能與感染香蕉病毒含量有關，顯示 qPCR 較 PCR 的靈敏度為高。

引用文獻

Burns, T. M., R. M. Harding, and J. L. Dale. 1994. Evidence that *banana bunchy top virus* has a multiple component genome. Arch. Virol. 137:371–380.

Chen, Y. and X. Hu. 2013. High-throughput detection of *banana bunchy top virus* in banana plants and aphids using real-time TaqMan® PCR. J. Virol. Methods 193:177–183.

Dale, J. L. 1987. Banana bunchy top: An economically important tropical plant virus disease. Adv. Virus Res. 33:301–325.

Harding, R. M., T. M. Burns, and J. L. Dale. 1991. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. J. Gen. Virol. 72:225–230.

Hu, J. S., M. Wang, D. Sether, W. Xie, and K. W. Leonhardt. 1996. Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of *banana bunchy top virus* by the banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*). Ann. Appl. Biol. 128:55–64.

Kawano, S. and H. J. Su. 1993. Occurrence of *banana bunchy top virus* in Okinawa. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 59:53. (in Japanese)

Kenyon, L., M. Brown, and P. Khonje. 1997. First report of *banana bunchy top virus* in Malawi. Plant Dis. 81:1096.

Kumar, P. L., R. Hanna, O. J. Alabi, M. M. Soko, T. T. Oben, G. H. P. Vangu, and R. A. Naidu. 2011. *Banana bunchy top virus* in sub-Saharan Africa: Investigations on virus distribution and diversity. Virus Res. 159:171–182.

Manser, P. D. 1982. Bunchy top disease of plantain. FAO/Plant Protection Bulletin 30:78–79.

Sun, S. K. 1961. Study on the bunchy top diseases of banana. Special Publ. Coll. Agri. Taiwan Univ. 10: 82–109.

Tsai, W. P., M. D. Huang, S. P. Chen, and S. S. Liu. 1986. Study on transmission of *banana bunchy top virus* by the banana aphid. Plant Prot. Bull. 28:147–153. (in Chinese with English abstract)

Vetten, H. J., P. W. G. Chu, J. L. Dale, R. Harding, J. Hu, L. Katul, M. Kojima, J. W. Randles, Y. Sano, and J. E. Thomas. 2005. The single stranded DNA viruses: Family *Nanoviridae*. p.343–352. *in*: Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (Fauquet C. M. ed.) Elsevier. London. 1259 pp.

Wardlaw, C. W. 1961. Banana Diseases: Including Plantains and Abaca. Longman, London. 684 pp.

Wu, R. Y. 1987. Characterization and Monoclonal Antibodies of the Virus Causing Banana Bunchy-top. Ph.D. Dissertation, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. 176 pp.

Wu, R. Y. and H. J. Su. 1990. Production of monoclonal antibodies against *banana bunchy top virus* and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. J. Phytopathol. 128:203–208.

Xie, W. S. and J. S. Hu. 1995. Molecular cloning, sequence analysis, and detection of *banana bunchy top virus* in Hawaii. Phytopathology 85:339–347.

Evaluation of Real-Time PCR Methods for the Detection of *Banana bunchy top virus*

Cheng- Ping Kuan[1,*], Yi-Lin Chang[2], Ching-Shan Tseng[3], and Tso-Chi Yang[4]

Abstract

Kuan, C. P., Y. L. Chang, C. S. Tseng, and T. C. Yang. 2019. Evaluation of real-time PCR methods for the detection of *Banana bunchy top virus*. J. Taiwan Agric. Res. 68(1):59–68.

Banana bunchy top virus (BBTV) is a damaging pathogen for banana, its detection being of critical importance to certification programs for Taiwan and worldwide. Here we report a quantitative real-time polymerase chain reaction assay (qPCR) based on TaqMan® chemistry to improve the diagnosis of this pathogen. Real-time PCR, targeting the amplification of CP gene fragment, was highly specific and capable of distinguishing BBTV from non-target banana viruses, *Cucumber mosaic virus* and *Banana steak virus*, which are two other common virus species in banana plants. The protocol was also evaluated for its specificity using healthy banana and water controls. None of the non-target or healthy samples reacted in qPCR. The developed technique is sensitive and reliable and allows rapid detection and quantitation of BBTV in both field and experimental material used for the surveillance and specific diagnosis of BBTV.

Key words: *Banana bunchy top virus*, BBTV, Detection.

Received: February 13, 2018; Accepted: October 1, 2018.
[*] Corresponding author, e-mail: pcr123@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Alternative Military Serviceman, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Research Fellow and Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(1):69–77 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201903_68(1).0007 研究報告

準確偵測冬季裡作偶然存在大、小油菜雜交後代之方法

杜元凱 [1] 陳涵葳 [1] 洪逸筑 [2] 林彥君 [3] 郭寶錚 [4,*]

摘要

杜元凱、陳涵葳、洪逸筑、林彥君、郭寶錚。2019。準確偵測冬季裡作偶然存在大、小油菜雜交後代之方法。台灣農業研究 68(1):69–77。

油菜為十字花科 (Brassicaceae) 蕓苔屬 (*Brassica*) 作物，與大豆、花生及向日葵並列為世界重要油料作物之一。為減少除草劑使用、提升種子質量與培育雄不稔品系，已有許多透過基因改造 (genetically modified; GM) 方式所培育出之基改油菜品系，然而基改油菜所造成之基因流佈 (gene flow) 為不可忽視之潛在問題。除可能與野生種及近緣種相互混雜，影響自然生態，亦可能使非基改作物遭受汙染，致使農民損失慘重。為有效監測基改油菜是否於田間發生非預期性混雜，需要建立一簡單、快速的雜交後代判別方式。本試驗利用「德雜油 18 號」模擬基改大油菜作為父本，再以台灣冬季裡作常見的小油菜品種「農興 80 天」作為母本，以人工雜交所得之後代。依據流式細胞儀結果為主，評估以外觀裂葉性狀及相關序列增幅多型性 (sequence-related amplified polymorphism; SRAP) 分子標誌判定是否為大、小油菜雜交後代之可行性，並進一步利用田間開放授粉所得之雜交後代進行驗證。結果顯示，人工雜交與開放授粉所得雜交後代之外觀形態均有偏向父本之情形，利用外觀裂葉性狀及 SRAP 分子標誌進行雜交後代判斷之敏感度、特異度、陽性預測值及陰性預測值為 100%，兩種檢定方式均能準確判別田間開放授粉所得 F_1 是否為雜交後代。此結果證實，利用外觀裂葉性狀及 SRAP 分子標誌具相當潛力應用於監測台灣冬季裡作期間，大、小油菜間是否發生因花粉飄散導致雜交後代發生情形。

關鍵詞：大油菜、小油菜、相關序列增幅多型性、裂葉性狀、種間雜交。

前言

十字花科 (Brassicaceae) 可細分為 18 個屬 3,700 多種植物，其中蕓苔屬 (*Brassica*) 最具經濟價值。根據 Nagaharu (1935) 的理論，蕓苔屬植物依基因組 (genome) 組成，可分為 3 個 2 倍體的原始基因組 (ancestral genome)，包括白菜類之所有物種 *Brassica rapa* (2n = AA = 20)、黑芥 *Brassica nigra* (2n = BB = 16)、甘藍 *Brassica oleracea* (2n = CC = 18)，以及 3 個異源多倍體的複合種，如甘藍型油菜 *Brassica napus* (2n = AACC = 38)、芥菜 *Brassica juncea* (2n = AABB = 36)、伊索比亞芥 *Brassica carinata* (2n = BBCC = 34)。經遺傳鑑定分類得知，相較於 A 與 B 基因組或 B 與 C 基因組之結合，A 與 C 基因組具有較近之親緣關係 (Chiou *et al*. 2012)。台灣的油菜栽培紀錄始於日據時代，白菜型油菜或一般熟稱的小油菜，是台灣常見的冬季裡作，除了可收取抽苔前的嫩葉食用外，亦可作為綠肥，具有改善土壤理化性質、抑制雜草生長、防治土壤沖刷等效用，開花期間可美化農村景觀並成為冬季重要蜜源之一。

甘藍型油菜或大油菜種子含油量豐富，提

投稿日期：2018 年 5 月 29 日；接受日期：2018 年 10 月 15 日。
* 通訊作者：bjkuo@nchu.edu.tw
1 行政院農業委員會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
2 國立中興大學農藝系研究助理。台灣 台中市。
3 行政院農業委員會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
4 國立中興大學農藝系教授。台灣 台中市。

煉之油品可供食用或工業用途，與大豆、花生及向日葵並列為世界重要之油料作物。加拿大培育低芥子酸油菜 (low erucic acid rapeseed; LEAT) 並以 ‘Canadian oil, low acid’ 作為行銷口號，之後便將加拿大生產的低芥子酸含量芥花油統稱為 ‘Canola’，多為 *B. napus*，但也有部分為 *B. rapa*。目前已推出 38 項基改大油菜品系，依目的可分為提升除草劑耐受性、調控授粉模式 (pollination control system)，以及改良質量性狀，如提升月桂酸 (lauric acid) (Del Vecchio 1996) 或表現植酸分解酶 (Maenz *et al*. 1999) 等。基改油菜的栽培以抗除草劑性狀為大宗，以加拿大為例，種植基改油菜具有高產量、低成本及高獲利等優點，農民種植基改油菜意願普遍提升 (Beckie *et al*. 2011)。

2016 年國際農業生物技術應用服務組織 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications; ISAAA) 統計資料顯示，目前已有 28 個國家允許基改作物栽培及商業化生產，全球栽培總面積達 1 億 8 千萬公頃，美國、巴西、阿根廷、加拿大及印度為主要種植區域。基因改造技術不斷更新，許多品系已商業化且大規模的種植，然而其中有許多未知的因子，對環境、食品安全及政治經濟可能造成的危害及衝擊。其中，環境因素包含生物多樣性 (biodiversity) 與基因流佈 (gene flow) (Nicolia *et al*. 2014)。當基改作物與非基改作物共存時，非基改作物田區很可能因為偶發性 (adventitious presence; AP) 的基因流佈現象而混雜基改作物，若原種植非基改作物田區已超過規定之混雜門檻 (threshold)，將會導致農民重大損失。外源基因流佈的樣態，包括花粉與種子，基改作物種子在採收、裝載、運輸的過程都有機會掉落而發展為自生族群 (volunteers)。油菜自生族群除了競爭空間、養分外，可能經過多次的雜交堆疊數種抗除草劑的性狀，或與十字花科作物及其野生近緣種雜交，而成為超級雜草 (super weed) (Warwick *et al*. 1999; Busi & Powles 2016)。德國 (Belter 2016)、日本 (Aono *et al*. 2011)、荷蘭 (Luijten *et al*. 2015) 都曾有基改種子流布紀錄。此外，*B. napus* 及 *B. rapa* 已證實可於自然環境下進行雜交並繁衍子代，雜交子代亦能與鄰近的 *B. rapa* 進行回交，發生基因流佈現象 (Jorgensen & Andersen 1994)。先前 Hong *et al*. (2016a, 2016b) 以台灣常見的 B. rapa 品系「農興 80 天」[*B. rapa* (campestris) L.] 作為母本，並蒐集 4 種中國培育及 1 種台灣自己育成的 *B. napus* 品系為父本，雜交試驗後所得子代經流式細胞儀 (flow cytometry; FCM) 確定為 3 倍體，證實於台灣氣候下，大、小油菜確實具有雜交風險。

本試驗以流式細胞儀判定結果作為雜交子代倍體數真值，評估溫室人工授粉與田間開放授粉下，改以子代裂葉 (lobed-leaf) 型態和相關序列增幅多型性 (sequence-related amplified polymorphism; SRAP) 分子標誌 2 種檢測方式，是否也具有穩定的倍體數鑑別效果。試驗配合二項分布估計有效抽樣數目，並以敏感度 (sensitivity; Sn)、特異度 (specificity; Sp)、陽性預測值 (positive predictive value; PPV) 及陰性預測值 (negative predictive value; NPV) 為評估參數；希望找到一個準確、簡單之方式，進行大、小油菜雜交子代倍體數高通量辨識，加速田間大、小油菜間基因流佈之監控。

材料與方法

植物材料

本試驗以大油菜「德雜油 18 號」作為花粉貢獻親 (父本，基因型為 AACC)，小油菜為花粉接受親 (母本，基因型為 AA)，選用國內常見的「農興 80 天」為材料。溫室人工授粉試驗於行政院農業委員會農業試驗所全密閉溫室進行，溫度約 21℃ ± 3℃而相對濕度約 80%。開花期間以鑷子摘取父本雄蕊藨於母本雌蕊上並套袋，收取授粉成功之果莢，待種子乾燥脫粒後存於夾鏈袋中。田間開放授粉試驗始於 2016 年二期稻作結束後，於農業試驗所生物技術組試驗田區進行，隨機選取大油菜「德雜油 18 號」下風處第 4 列 (35 cm) 處 20 個小油菜「農興 80 天」採樣點，收取種子後進行子代分析。隨機挑選適量的種子，置於濕濾紙上進行催芽，幼苗高約 1 cm 時移植 5 吋黑色軟盆

中，每週澆灌稀釋 1,000× 之花寶 2 號水溶液 (Hyponex, Osaka, Japan)。

雜交子代鑑別

流式細胞儀判定法：待幼苗生長至 4–5 葉齡，選取幼嫩葉片進行分析，每次上機均以同一株「農興 80 天」之幼嫩葉片為標準品，將其 G0/G1 期的螢光讀值固定於 50，並由樣品的相對 DNA 含量推估倍體數。待測樣品切取 1 cm^2 之尖端葉片，於 150 µL nuclei extraction buffer 中切碎，再加入 600 µL staining buffer 靜置染色 2 min 後過濾，濾液以流式細胞儀 (Partec PA, Partec GmbH, Münster, Germany) 分析細胞核 DNA 螢光讀值。

葉部型態判定法：裂葉性狀係參考植物新品種保護國際聯盟 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants; UPOV) 對大油菜葉片外觀之描述 (International Union for the Protection of New Varieties of Plants 2002)。依據 UPOV 定義，油菜生長達 23–27 d 時期為合適起始觀察時期，若部分葉身 (leaf blade) 之長度與葉柄 (leaf petiole) 連接處之長度相同且其位於較高處葉身之缺口 (notch) 之長度至少為本身長度的一半，則可被視為裂葉。其餘觀察性狀，同 Hong *et al*. (2016a) 所提及之葉緣形狀、葉片是否具蠟質、葉色及基生葉是否具裂葉等特徵。

SRAP 分子標誌判定法：待幼苗生長至四至五葉齡，選取幼嫩葉片抽取 DNA，經超微量分光光度計 (Thermo, Waltham, MA, USA) 定量後稀釋為 100 ng μL^{-1}，保存於攝氏 -20℃。為確保抽取 DNA 品質，以 *Tub 6* 基因作為 internal control 進行增幅，Polymerase chain reaction (PCR) 反應中含 0.5 µL gDNA、0.5 µL 之 Br_TUB6_f (5’-GTGGAATGGATACCGAAC-3’) 及 Br_TUB6_r (5’-GTTGCGTCTTGGTATTGC-3’)、0.25 µL Takara *Ex Taq* Polymerase、2.5 µL *Ex Taq* 10 × Buffer、2 µL dNTP Mixture，並加入 18.75 µL ddH_2O 使總體積達 25 µL。反應條件為 94℃持續 5 min，再以 4℃、52℃、72℃各 30 s 並循環 35 次，最後於 72℃持續 7 min 進行延展。SRAP 引子序列參考 Li & Quiros (2001)，選擇引子對 SRAP_me5f (5’-TGAGTCCAAACCGGAAG-3’) 及 SRAP_em1r (5’-GACTGCGTACGAATTA AT-3’) 進行增幅，增幅條件同 Hong *et al*. (2016a)。PCR 反應結束後，以 1.8% 之瓊脂膠體電泳分離，膠體染色後進行影像判讀。

診斷檢定 (diagnostic test)

本試驗以流式細胞儀確認「農興 80 天」及人工授粉子代之相對倍體數，並作為診斷檢定之真值，再分別進行外觀裂葉性狀及 SRAP 分子標誌之診斷檢定。檢定結果均採二分法，子代雜交者，檢定結果記錄為「有」，未雜交者記錄為「無」。檢定結果之 Sn、Sp、PPV 及 NPV 計算方式參考 Akobeng (2007)。

$$\mathrm{Sn} = \frac{\text{檢驗為雜交者}}{\text{雜交之族群}},$$

代表一族群中，雜交者能被找出之機率。

$$\mathrm{Sp} = \frac{\text{檢驗為未雜交者}}{\text{未雜交之族群}},$$

代表一族群中，未雜交者能被排除之機率。

$$\mathrm{PPV} = \frac{\text{實為雜交者}}{\text{檢驗為雜交之族群}},$$

代表所有檢驗為雜交之族群中，實際為雜交者之機率。

$$\mathrm{NPV} = \frac{\text{實未雜交者}}{\text{檢驗為未雜交之族群}},$$

代表所有檢驗為未雜交之族群中，實際為未雜交者之機率。

結果

溫室人工授粉子代倍體數判定

逢機挑選 258 株溫室人工授粉子代進行試驗，待幼苗生長至 4–5 葉齡時進行流式細胞儀分析，每次上機均以同一株「農興 80 天」之幼

嫩葉片為標準品，將其 G0/G1 期的螢光讀值固定於 50，花粉貢獻親「德雜油 18 號」之 G0/G1 螢光讀值為 108.92 ± 7.64 (圖 1)。受試的 258 個樣品中，130 個樣品 G0/G1 螢光峰值落於 51.24 ± 4.26，與對照品種「農興 80 天」螢光讀值重疊，判定為沒有發生雜交的 2 倍體 (AA)。另外，128 個樣品 G0/G1 螢光峰值則為 76.23 ± 4.10，介於「農興 80 天」與「德雜油 18 號」間，判定為有發生雜交的 3 倍體 (AAC) (圖 1)。

溫室人工授粉子代外觀性狀與 SRAP 分子標誌判定

本試驗觀察前述 258 株溫室人工授粉子代外觀性狀，經流式細胞儀判定為沒有發生雜交的 130 株子代，幼葉邊緣 (margin) 呈細小波浪狀 (undulation)，沒有絨毛 (圖 2A)，成熟葉顏色較淺呈倒湯匙狀，無明顯裂葉特徵，葉面光滑無蠟質 (wax)，與照品種「農興 80 天」一致 (圖 2D)。經流式細胞儀判定為有發生雜交的 128 株子代，幼葉與成熟葉片外觀近似花粉貢獻親「德雜油 18 號」，幼葉葉緣鋸齒明顯，具有絨毛 (圖 2B–2C)。生長週期間之成熟基生葉部分，可發現符合 UPOV 描述之裂葉性狀，葉色較深，部分雜交子代葉表面具有蠟質，初步觀察蠟質較「德雜油 18 號」少 (圖 2D–2E)。258 株子代中僅有 128 株為實際雜交成功，成功率偏低，主要原因為母本並未特別進行除雄或進行蕾期授粉。另利用 SRAP 分子標誌分析 258 株溫室人工授粉子代，結果顯示經流式細胞儀判定為有發生雜交的 128 株子代，其條帶位置分布與花粉貢獻親「德雜油 18 號」一致。於 1,000 bp 處有一特異性條帶，沒有發生雜交的 130 株子代，其條帶分布則與照品種「農興 80 天」較為一致，1,000 bp 位置皆無增幅條帶 (圖 3)。

田間開放授粉子代倍體數診斷分析

挑選田間開放授粉試驗下風處第 4 列 (35 cm) 處 20 個採樣點，隨機選取 155 顆種子進行催芽，調查子代裂葉性狀及 SRAP 分子標誌，以進行子代倍體數判定。裂葉性狀與 SRAP 分子標誌判定法，皆判斷其中 139 株子代為沒有發生雜交的 2 倍體，另外 16 株則為有發生雜交的 3 倍體，經流式細胞儀確認倍體數判定無誤。裂葉性狀與 SRAP 分子標誌判定法之 Sn、Sp、PPV 與 NPV 皆為 100% (表 1)，兩種判定方法的準確度與流式細胞儀倍體數判定一致，具有良好的鑑別效果。

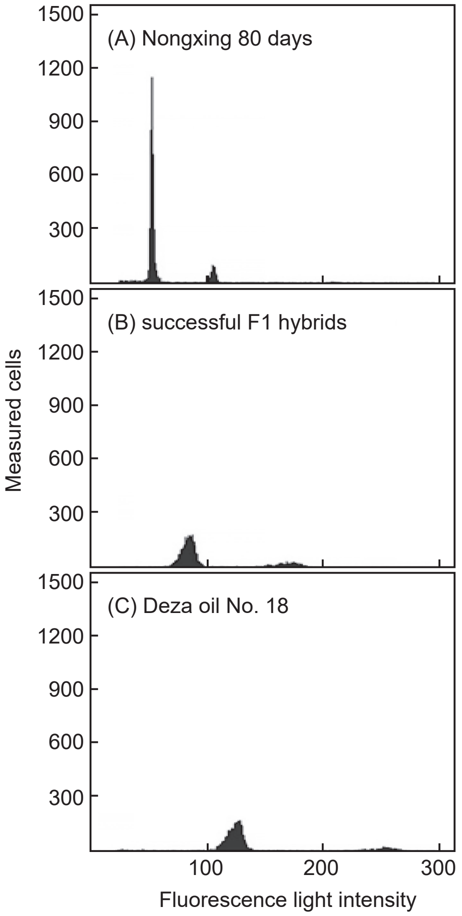

圖 1. 以流式細胞儀判斷雜交子代相對核酸含量。(A)「農興 80 天」；(B) 雜交子代；(C)「德雜油 18 號」。

Fig. 1. Flow cytometry analysis of the DNA content of (A) 'Nongxing 80 days'; (B) successful F1 hybrids; and (C) 'Deza oil No. 18'.

討論

台灣目前尚未核准任何基改作物種植，但開放基改油菜種子進口作為榨油使用，運送途中種子外流而造成基改大油菜自生族群的案例已在國外被證實。為了強化國內基改作物檢監

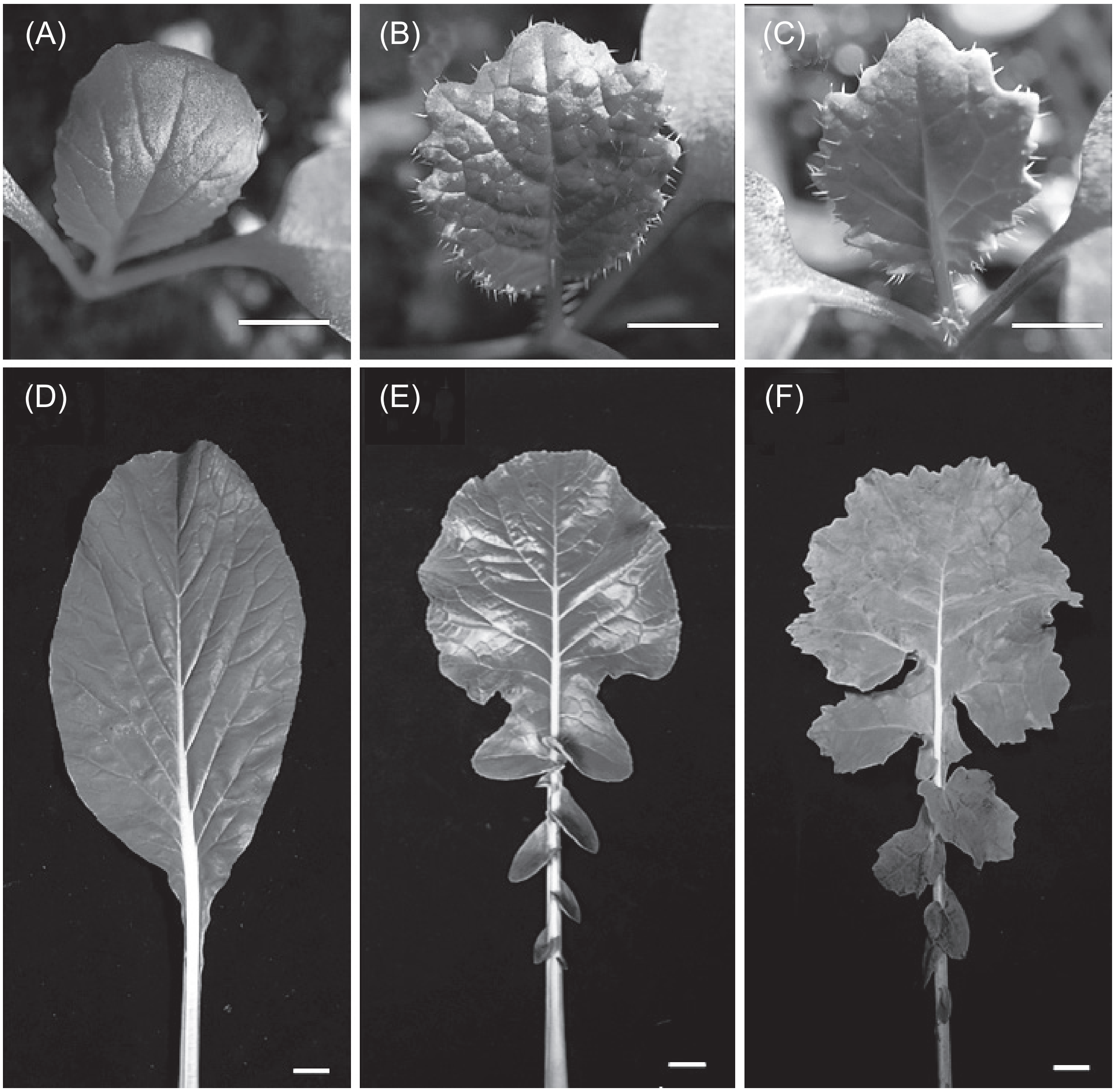

圖 2. 植株幼葉與成熟葉片外觀性狀。(A、D)「農興 80 天」。(B、E) 雜交子代。(C、F)「德雜油 18 號」。標尺 = 1 cm。

Fig. 2. The phenotypes of young leaves and mature leaves in 'Nongxing 80 days' (A, D); 'Deza oil No. 18' (B, E); and successful F_1 hybrids (C, F). Bar = 1 cm.

測效能，本研究以「德雜油 18 號」模擬基改大油菜發生流布的情況，並發展雜交子代快速鑑別法。Luijten *et al*. (2015) 利用流式細胞儀、顯微鏡觀測及 AFLP 的方式得知，*B. rapa* 與 *B. napus* 雜交後代之基因組為 AAC；「農興 80 天」基因型為 AA，作為花粉貢獻親之「德雜油 18 號」基因型為 AACC，兩者雜交子代之基因組亦應為 AAC。由圖 1 流式細胞儀倍體數判定結果可知，「德雜油 18 號」的核酸含量約為「農興 80 天」的兩倍，雜交子代之核酸含量則介於兩親本間，與 Hong *et al*. (2016a) 之結果相符。Chiou *et al*. (2012) 曾以流式細胞儀鑑別芥藍 (*B. oleracea*) 與油菜 (*B. rapa*) 種間雜交子代，其子代的核酸含量亦介於兩親本間，顯示流式細胞儀是判斷子代相對核酸含量或倍體數的有效工具。

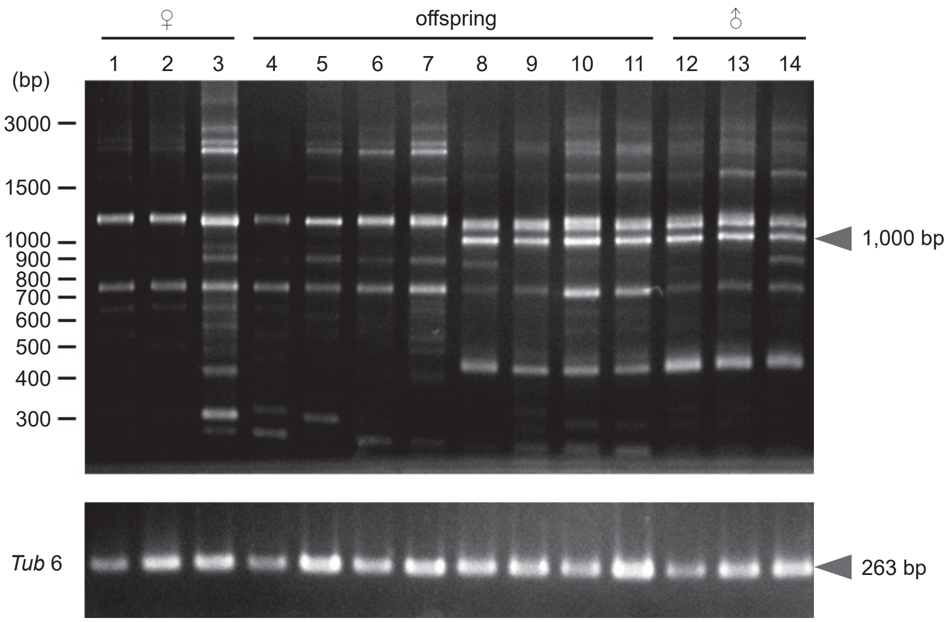

圖 3. 利用 SRAP 分子標誌判定雜交子代。以 1,000 bp 之特異性條帶作為鑑別雜交子代之依據。Lanes 1–3 為母本「農興 80 天」；Lanes 4–7 為無特異性條帶之子代；Lanes 8–11 為有特異性條帶之子代；Lanes 12–14 為父本「德雜油 18 號」。

Fig. 3. Hybrids detection method by SRAP marker analysis. Specific band amplification (1,000 bp) was used as the molecular marker. Lanes 1–3: 'Nongxing 80 days' (♀); Lanes 4–7: unsuccessful F_1 hybrids; Lanes 8–11: successful F_1 hybrids; and Lanes 12–14: 'Deza oil No. 18' (♂).

表 1. 評估子代外觀裂葉性狀 (lobe) 及 SRAP 分子標誌結果。檢定結果以 Sn、Sp、PPV 及 NPV 做為評估參數。

Table 1. Determination of sensitivity (Sn), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) between the two different diagnostic tests.

Item	SRAP	Lobe
Sn	100%	100%
Sp	100%	100%
PPV	100%	100%
NPV	100%	100%

流式細胞儀判定方法相當快速、準確，但需要購置昂貴的儀器與耗材，不適合作為隨機抽樣篩檢或大量鑑別用途。本研究嘗試以外觀性狀或 SRAP 分子標誌判定法判斷雜交子代，作為流式細胞儀判定法的替代方案。本研究發現，台灣冬季裡作常見的「農興 80 天」，幼葉葉緣呈波浪狀、不具絨毛，基生葉無裂葉特徵。「德雜油 18 號」幼葉邊緣呈鋸齒狀，基生葉亦有明顯裂葉性狀，葉色深且有蠟質分布，雜交子代之外觀性狀與父本「德雜油 18 號」較為接近，幼葉邊緣有鋸齒缺刻，生長期間成熟基生葉亦展現類似大油菜的裂葉特徵。惟雜交子代葉色稍淡，部分子代葉表面具有蠟質，但相對較少於「德雜油 18 號」(圖 2)。油菜基生葉裂葉性狀的調控機制尚未釐清，基因層次的研究仍須進行，但此一性狀容易判斷且具有相當的辨識度，適合作為鑑別雜交的型態標誌 (Ni *et al*. 2015)。而葉面蠟質的部分，雜交子代與「德雜油 18 號」成熟葉均帶有蠟質，葉表面的蠟質是由極長鏈烴 (very

long-chain hydrocarbon compounds; VLCHC) 作為主要成分。*B. oleracea* (CC 基因型) 葉表面具有蠟質分布，已證實由多基因調控 (Laila *et al*. 2016)，推測蠟質形成相關調控基因應座落於 C 基因組有關。本研究使用「德雜油 18 號」基因組為 AACC，「農興 80 天」基因型為 AA，雖觀察部分雜交子代 (AAC) 葉表亦具有蠟質，但葉表面蠟質容易因為葉片間摩擦、澆水、老化等原因而脫落，恐無法有效的作為外觀性狀判定用途。另於 SRAP 分析部分，利用 SRAP_me5f 與 SRAP_em1r 引子對所增幅 1,000 bp 之特異性條帶，可有效鑑別「農興 80 天」、「德雜油 18 號」與雜交子代，雖同品系個體間可能存在些微遺傳組成差異，如「農興 80 天」為開放授粉品系。由於本研究僅使用特定位置之條帶，在「德雜油 18 號」與雜交子代具有穩定再現性，又診斷檢定 Sp、Sn、PPV 及 NPV 幾可達 100%，說明本試驗使用品系內個體間遺傳組成的差異並不影響「農興 80 天」、「德雜油 18 號」與雜交子代之判讀。另外，「德雜油 18 號」與雜交子代皆帶有 C 基因組 DNA，合理推測 1,000 bp 之特異性條帶應座落於 C 基因組，然其是否具有特定基因功能，仍需進一步研究探討。

本篇研究期望能為找出可鑑別「農興 80 天」、「德雜油 18 號」及其雜交子代的差異之方式，當未來我國發現可能為 *B. rapa* 與基改 *B. napus* 之雜交後代時，期望能提供準確、快速且簡便的判別方式，易於田間實地作業使用，除判別兩者是否發生雜交外，亦能監測田間基因流佈之情形。本研究中發現，當雜交子完整生長期間之基生葉，皆可觀察到明顯的裂葉性狀。PCR 技術方面，則可利用 SRAP 之 1,000 bp 條帶做為鑑別標誌。研究中均以有效的抽樣數目確立基因型與兩種檢定方法間之關係，證明以兩種檢定方式均可得知是否為雜交子代。然而若以田間大規模進行觀測、篩檢情況而言，考慮時間、人力以及經費等成本支出，直接以裂葉性狀判別植株是否發生雜交是較為容易且簡便之方式，倘若對目標植株仍有疑慮時，則可進一步利用流式細胞儀或 SRAP 等檢定方式加以確認。本研究亦希望未來能利用 SRAP 及裂葉性狀判定等兩種檢定方式，並能實際應用於檢測各種不同大小油菜之雜交後代，成為準確又簡便的檢定方式。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 106 農科-6.3.2-農-C1 計畫經費支持，謹致謝忱。

引用文獻

Akobeng, A. K. 2007. Understanding diagnostic tests 1: Sensitivity, specificity and predictive values. Acta Paediatr. 96:338–341.

Aono, M., S. Wakiyama, M. Nagatsu, Y. Kaneko, T. Nishizawa, N. Nakajima, M. Tamaoki, A. Kubo, and H. Saji. 2011. Seeds of a possible natural hybrid between herbicide-resistant *Brassica napus* and *Brassica rapa* detected on a riverbank in Japan. GM Crops 2:201–210.

Beckie, H. J., K. N. Harker, A. Légère, M. J. Morrison, G. Séguin-Swartz, and K. C. Falk. 2011. GM canola: The Canadian experience. Farm Pol. J. 8:43–49.

Belter, A. 2016. Long-term monitoring of field trial sites with genetically modified oilseed rape (*Brassica napus* L.) in Saxony-Anhalt, Germany. Fifteen years persistence to date but no spatial dispersion. Genes 7:3.

Busi, R. and S. B. Powles. 2016. Transgenic glyphosate-resistant canola (*Brassica napus*) can persist outside agricultural fields in Australia. Agric. Ecosyst. Environ. 220:28–34.

Chiou, C. C., T. K. Lin, C. Y. Lin, C. N. Hsia, and S. T. Wang. 2012. Identification of interspecific hybrids from crosses between *Brassica oleracea* and *B. campestris*. J. Taiwan Agric. Res. 61:52–63. (in Chinese with English abstract)

Del Vecchio, A. J. 1996. High laurate canola: How Calgene's program began, where it's headed. Inform. 7:230–242.

Hong, H., T. K. Lin, Y. K. Du, and B. J. Kuo. 2016a. Identifying the F1 hybrids of the simulated GM *Brassica napus* and *Brassica rapa*. Crop Environ. Bioinform. 13:53–66. (in Chinese with English abstract)

Hong, H., T. K. Lin, Y. K. Du, and B. J. Kuo. 2016b. Using SRAP marker to identify the difference among *Brassica rapa*, *Brassica napus*, and F1 Hybrids. Crop Environ. Bioinform. 13:208–222. (in Chinese with English abstract)

International Union for the Protection of New Varieties of Plants. 2002. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Rape seed (*Brassica napus* L. *oleifera*). UPOV, Geneva, Switzerland. https://www.upov.int/en/publications/tg-rom/tg036/tg_36_6_corr.pdf (visit on 2/1/2018)

Jorgensen, R. B. and B. Andersen. 1994. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (Brassicaceae): A risk of growing genetically modified oilseed rape. Amer. J. Bot. 81:1620–1626.

Laila, R., A. H. K. Robin, K. Yang, J. I. Park, M. C. Suh, J. Kim, and I. S. Nou. 2016. Developmental and genotypic variation in leaf wax content and composition, and in expression of wax biosynthetic genes in *brassica oleracea* var. *capitata*. Front. Plant Sci. 7:1972.

Li, G. and C. F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theor. Appl. Genet. 103:455–461.

Luijten, S. H., N. S. Schidlo, P. G. Meirmans, and T. J. de Jong. 2015. Hybridisation and introgression between *Brassica napus* and *B. rapa* in the Netherlands. Plant Biol. 17:262–267.

Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan, R. W. Newkirk, and H. L. Classen. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. Anim. Feed Sci. Technol. 81:177–192.

Nagaharu, U. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. J. Jpn. bot. 7:389–452. (in Japanese)

Ni, X., J. Huang, B. Ali, W. Zhou, and J. Zhao. 2015. Genetic analysis and fine mapping of the *LOBED-LEAF 1* (*BnLL1*) gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). Euphytica 204:29–38.

Nicolia, A., A. Manzo, F. Veronesi, and D. Rosellini. 2014. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. Crit. Rev. Biotechnol. 34:77–88.

Warwick, S. I., H. J. Beckie, and E. Small. 1999. Transgenic crops: New weed problems for Canada? Phytoprotection 80:71–84.

The Accurate Detection Methods for the Adventitious Presence (AP) of Hybrids of *Brassica napus* and *Brassica rapa* (campestris) L. during Winter Cropping in Taiwan

Yuan-Kai Tu[1], Han-Wei Chen[1], Yi-Chu Hung[2], Yen-Chun Lin[3], and Bo-Jein Kuo[4,*]

Abstract

Tu, Y. K., H. W. Chen, Y. C. Hung, Y. C. Lin, and B. J. Kuo. 2019. The accurate detection methods for the adventitious presence (AP) of hybrids of *Brassica napus* and *Brassica rapa* (campestris) L. during winter cropping in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 68(1):69–77.

Brassica oilseed is a member of Brassicaceae and is one of the major oil crops along with *Glycine max*, *Arachis hypogaea* and *Helianthus annuus* in the world. Nowadays, many genetically modified (GM) commercialized oilseeds have been bred in order to reduce the use of pesticide and herbicide. However, GM crops may cause the gene flow problem and result in hybridization with wild species or relative species. Therefore, the GM oilseed may cause the contamination of non-GM relatives. As a result, it is necessary to establish a fast and reliable detection method to efficiently discriminate F_1 hybrid derived from crossing GM with non-GM oilseed. In this study, *Brassica napus* from Mainland China called 'Deza oil No.18' was used as donor parent and the winter cropping *Brassica rapa* in Taiwan named 'Nongxing 80 days' was used as recipient parent to produce the F1 hybrids. In this study, we tested the feasibility of detection methods, including flow cytometry (FCM), lobed-leaf trait investigation and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker analysis. Firstly, the aforesaind detection methods were used to examine the F_1 hybrids derived from crossing by artificial pollination. Then, we verified the detection methods using F_1 hybrids obtained from natural crossing in the field. The results showed that regardless of the F_1 hybrid collected from artificial-crossing or natural-crossing, lobed-leaf investigation and SRAP marker analysis were able to efficiently and robustly identify the F_1 hybrids. Besides, to some extent, we also found that F_1 hybrids are very similar in morphology to their donor parent. Values of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were 100%. The lobed-leaf discrimination and SRAP marker analysis methods could be used for correctly detecting the adventitious presence (AP) of hybrids derived from crossing *B. napus* and *B. rapa* in Taiwan.

Key words: *Brassica napus*, *Brassica rapa*, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), Lobed-leaf trait, Interspecific hybridization.

Received: May 29, 2018; Accepted: October 15, 2018.
* Corresponding author, e-mail: bjkuo@nchu.edu.tw
1 Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistant, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(1):78–89 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201903_68(1).0008 研究報告

化學殺蟲劑及有色黏紙對蕹菜小金花蟲 (*Chaetocnema confinis* Crotch) 防治效果之初探

梁鈺平 [1]　陳柏宏 [1,*]

摘要

梁鈺平、陳柏宏。2019。化學殺蟲劑及有色黏紙對蕹菜小金花蟲 (*Chaetocnema confinis* Crotch) 防治效果之初探。台灣農業研究 68(1):78–89。

蕹菜小金花蟲 (*Chaetocnema confinis* Crotch) 為甘藷 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 常見之害蟲，其幼、成蟲分別為害藷塊及藷葉，影響產量及品質。本研究針對蕹菜小金花蟲成蟲，初步於室內評估現行登記及延伸使用殺蟲劑的藥效，以及有色黏紙誘捕效果。經圓葉法檢測 9 種殺蟲劑對蕹菜小金花蟲之致死性，結果顯示 20% 亞滅培 (acetamiprid) 可濕性粉劑、20% 達特南 (dinotefuran) 水溶性粒劑、20% 芬化利 (fenvalerate) 乳劑及 43% 佈飛松 (profenofos) 乳劑之殺蟲效果較佳，處理後第 3 日的死亡率分別可達 96、82、82 及 82%。關於有色黏紙的田間誘捕效果，5 種顏色 (螢光黃色、黃色、綠色、藍色及白色) 以螢光黃色所誘捕蟲數最多 (21.8 隻/黏紙)，藍色黏紙的效果最差 (1.4 隻/黏紙)。另根據各黏紙光譜相對反射率曲線，推測波長落在 530 nm 左右之光線對蕹菜小金花蟲較具吸引力。不同高度下，擺放位置低於甘藷植冠的效果較佳，且捕捉蟲數隨擺放高度增加而顯著減少。此外，黏紙誘引效果亦受設置方位影響，本次試驗中面朝南方的黏紙捕捉蟲數最多，平均為 38.8 隻/黏紙，而朝北面的蟲數則最少。

關鍵詞：蕹菜小金花蟲、殺蟲劑、有色黏紙。

前言

蕹菜小金花蟲 (*Chaetocnema confinis* Crotch) 屬於鞘翅目金花蟲科 (Coleoptera: Chrysomelidae)，為甘藷 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 常見之害蟲，主要分布於亞洲、美洲及非洲等地，於熱帶地區終年均會發生。成蟲以寄主葉片為食，造成葉面呈現凹陷的褐色線形食痕，幼蟲則於土中嚙食根部並於塊根表面形成線狀孔道，嚴重影響甘藷葉及藷塊品質 (Chalfant *et al*. 1990; Jolivet 2008; Hayashikawa *et al*. 2013)，而甘藷受害程度則因品種而異 (Abney & Kennedy 2011; Hayashikawa *et al*. 2015)。除甘藷之外，蕹菜小金花蟲尚會危害其他旋花科 (Convolvulaceae) 植物，如蕹菜 (*Ipomoea aquatic* Forssk.) 及牽牛花 [*Ipomoea nil* (L.) Roth.] 等 (Jolivet 2008)。有關此害蟲於田間的發生生態，於日本九州種子島之研究顯示，5 月中旬至 10 月之甘藷栽培期間，8 月下旬至 9 月上旬為該害蟲密度高峰期，成蟲入侵田區 3 wk 後即可觀察到藷塊受害，危害率可達 50–70% (Hayashikawa *et al*. 2014)。

施用化學殺蟲劑為防治蕹菜小金花蟲的慣用方式之一 (Chalfant *et al*. 1990)。在甘藷定植前於土壤中施用 0.5% 芬普尼 (fipronil) 粒劑 (6 kg ha^{-1})，可大幅減少蕹菜小金花蟲幼蟲危害 (Hayashikawa & Fukuda 2016)。多種有機磷類 (organophosphates)、胺基甲酸鹽類 (carbamates)、除蟲菊酯類 (pyrethroids) 及新尼古丁類 (neonicotinoids) 等化學殺蟲劑對於蕹菜

投稿日期：2018 年 6 月 11 日；接受日期：2018 年 11 月 3 日。
* 通訊作者：chenph@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

小金花蟲成蟲，亦於室內測試具優異之殺蟲效果 (Hayashikawa & Fukuda 2016)。我國目前登記於葉用甘藷或甘藷之金花蟲類害蟲防治殺蟲劑則為納乃得 (methomyl)，且另有 8 種延伸使用藥劑，包含二福隆 (diflubenzuron)、可芬諾 (chromafenazide)、佈飛松 (profenofos)、亞滅培 (acetamiprid)、芬化利 (fenvalerate)、培丹 (cartap)、硫敵克 (thiodicarb) 及達特南 (dinotefuran) 等 (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute 2018)。

由於化學防治常造成昆蟲抗藥性、環境汙染等問題，兼用其他非農藥防治技術亦相當重要。傳統農事操作，如清園、覆蓋抑草蓆及田區淹水等，皆可有效降低土壤內蕹菜小金花蟲幼蟲密度 (Chalfant *et al*. 1990; Jasrotia *et al*. 2008; Hayashikawa *et al*. 2015)，而針對成蟲，設置有色黏紙或為可行的物理防治途徑。有色黏紙透過顏色吸引昆蟲趨前而黏捕之，以達到監測、偵測或大量誘殺之目的，於鞘翅目 (Coleoptera)、纓翅目 (Thysanoptera)、半翅目 (Hemiptera) 及雙翅目 (Diptera) 等多種昆蟲上皆有運用的案例 (Thein *et al*. 2011; Broughton & Harrison 2012; Li *et al*. 2017; Toshove *et al*. 2017)。因昆蟲對不同波長光線的感受性有所差異，故誘引效果受陷阱顏色影響，例如藍色及黃色對某些薊馬種類之誘捕效果較佳，吉丁蟲 (*Agrilus planipennis* Fairmaire) 則偏好紫色及綠色 (Al-Ayedh & Al-Doghairi 2004; Durmuşoğlu *et al*. 2009; Broughton & Harrison 2012; Poland & Mccullough 2014)。此外，黏紙的形狀、面積、擺放高度及背景色亦是影響誘引效果的重要因子 (Mainali & Lim 2010; Cottrell 2017; Yadav *et al*. 2017)。

有鑑於國內目前於蕹菜小金花蟲之防治相關研究較少，故而本研究擬探討現行葉用甘藷或甘藷金花蟲類害蟲防治藥劑，對於蕹菜小金花蟲成蟲於室內進行藥效試驗。另經由田間試驗，評估有色黏紙及其擺放方式的誘捕效果差異，以作為防治上之參考依據。

材料與方法

供試藥劑

試驗藥劑共 9 種，皆為推薦防治葉用甘藷及甘藷金花蟲類的登記或延伸使用藥劑 (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute 2018)，分別為 20% 亞滅培可濕性粉劑 (推薦稀釋倍數 2,000×；台灣住友商事股份有限公司，台灣台北市)、50% 培丹水溶性粉劑 (推薦稀釋倍數 1,000×；立農化學股份有限公司，台灣雲林縣)、5% 可芬諾水懸劑 (推薦稀釋倍數 1,000×；億豐農化廠股份有限公司，台灣台中市)、25% 二福隆可濕性粉劑 (推薦稀釋倍數 1,500×；萬得發有限公司，台灣台中市)、20% 達特南水溶性粒劑 (推薦稀釋倍數 3,000×；惠光股份有限公司，台灣台南市)、20% 芬化利乳劑 (推薦稀釋倍數 3,000×；台灣住友商事股份有限公司，台灣台北市)、40% 納乃得水溶性粉劑 (推薦稀釋倍數 1,500×；台灣杜邦股份有限公司，台灣台北市)、43% 佈飛松乳劑 (推薦稀釋倍數 1,000×；台灣先正達股份有限公司，台灣台北市) 及 34% 硫敵克水懸劑 (推薦稀釋倍數 1,000×；萬得發有限公司，台灣台中市)。試驗藥劑按推薦施用濃度及其減半濃度 (0.5×)，以去離子水稀釋後作為供試藥液。另以去離子水為對照處理。

室內藥效試驗

供試昆蟲為蕹菜小金花蟲成蟲，採集自嘉義市東區行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所內種植之甘藷田區，於蟲籠 (47.5 cm × 47.5 cm × 47.5 cm) 內以葉用甘藷「台農 71 號」(‘Tainung 71’) 盆栽飼養 2 d 後始進行試驗。試驗流程如下：將完全展開之「台農 71 號」甘藷葉片洗淨並切割為圓片 (直徑 2.7 cm)，而後浸泡於供試藥液中 5 s，再置於不銹鋼試管架上，於室溫下待其自然風乾後，放入玻璃指形管 (高 10 cm × 直徑 3 cm)，管底塞入濕潤棉球以維持濕度。葉片置入時，葉正面朝上整平以利成蟲取食 (Feng *et al*. 2000)。將供試昆蟲以二氧化碳迷昏後放入上述指形管內，管口以戳洞的石蠟膜及紗網封口。每管置入 10 隻

成蟲，每處理各 5 重複。指形管放置於生長箱中，環境溫度為 25℃ ± 2℃，光暗週期為 12 L : 12 D。每隔 1 d 觀察並記錄死亡蟲數 (抽搐者視為死亡)，共觀察 3 d。

顏色、高度及張貼方位對黏紙誘引效果之影響

試驗使用黏紙為市售產品，顏色種類包含螢光黃 (fluorescent yellow) (DD-209-01，大協技研工業株式會社，日本神奈川縣)、黃 (IATP，高冠企業股份有限公司，台灣南投市)、綠 (IATPGR，高冠企業股份有限公司，台灣南投市)、藍 (IATPBL，高冠企業股份有限公司，台灣南投市) 及白色 (FATP，高冠企業股份有限公司，台灣南投市)。各色黏紙光譜相對反射率曲線 (spectral reflectance curves) 如圖 1 所示，黏紙反射光譜係經由光譜儀 (miniature fiber optic spectrometers S2000, Ocean Optics Inc., Largo, FL, USA) 量測，測波長範圍為 300–700 nm，投射光源採用 balanced deuterium tungsten halogen light source (DH-2000-BAL, Ocean Optics Inc., Largo, FL, USA)。燈源光波長範圍為 200–1,100 nm，並以標準白 (Spectralon® diffuse white standard, Labsphere, Inc., North Sutton, NH, USA) 及無投射光源 (暗參考值) 校正反射率。透過反射探棒 (其內共 7 條光纖，6 條光纖排列周圍以傳送投射光源，中央 1 條光纖傳送反射光譜訊號) 導引投射光源至受測樣品表面；探棒距離樣品約 5 mm，垂直於其上，物體反射光源則以探棒中間光纖傳送至光譜儀。光譜反射率 (% R_λ) 經由標準白光譜反射強度 (S_λ)、暗參考值光譜反射強度 (D_λ) 及受測黏紙光譜反射強度 (R_λ) 運算求得，運算公式如下：

$$\% R_\lambda = \frac{S_\lambda - D_\lambda}{R_\lambda - D_\lambda} \times 100\%$$

各色黏紙效果評估試驗：試驗區位於嘉義市嘉義農業試驗分所內之甘藷田，田區面積約 1,000 m^2，田畦為南北向，畦寬約 0.5 m。栽培品種為「台農 57 號」(‘Tainung 57’)，插植時

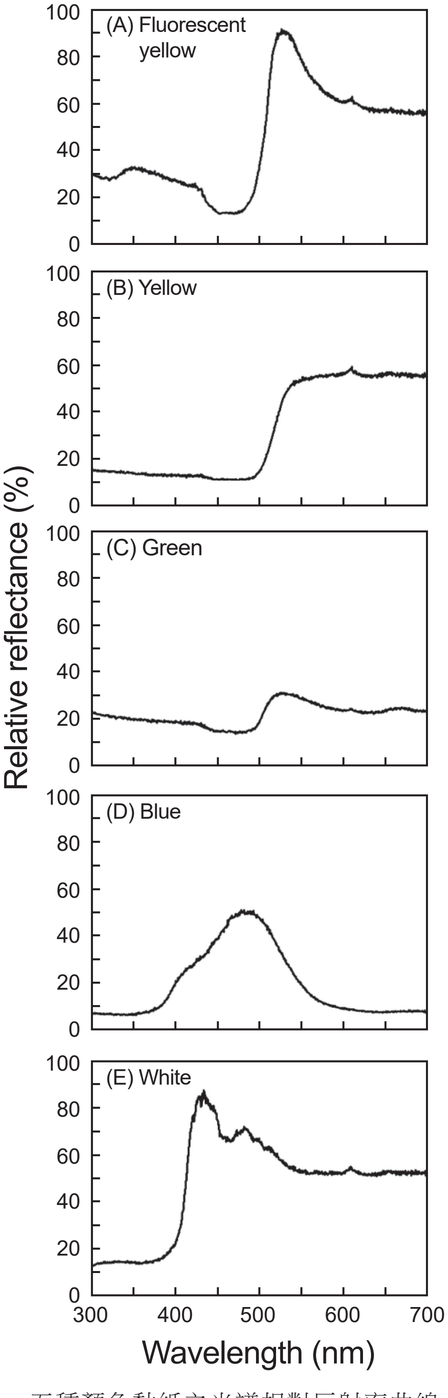

圖 1.　五種顏色黏紙之光譜相對反射率曲線。(A) 螢光黃色黏紙；(B) 黃色黏紙；(C) 綠色黏紙；(D) 藍色黏紙；(E) 白色黏紙。

Fig. 1.　The spectral reflectance curves of 5 different colored sticky cards. (A) Fluorescent yellow sticky card; (B) Yellow sticky card; (C) Green sticky card; (D) Blue sticky card; and (E) White sticky card.

間為 2017 年 10 月底。各色黏紙均裁切為固定大小之矩形 (10 cm × 15 cm)，以鐵桿固定懸掛於田畦上，紙張短邊平行畦面且下緣與甘藷葉冠齊平 (中心點距離甘藷植株葉冠 7.5 cm)，具黏性面朝向南方，兩鄰近黏紙間距為 3 m。試驗配置採完全逢機設計 (completely randomized design)，每處理為 8 重複。試驗於設置後第 7 日，計算各黏紙上之蘿菜小金花蟲成蟲數量。

不同懸掛高度之效果評估試驗：黏紙顏色為採用螢光黃色，檢測高度區分為黏紙高於植株葉冠 (中心點高於甘藷植株葉冠 7.5 cm、17.5 cm 及 27.5 cm) 及黏紙低於植株葉冠 (中心點低於甘藷葉冠 7.5 cm)。此外，低於葉冠之黏紙為固定於畦溝間，黏紙距植株中心之水平距離約 40 cm，具黏性面朝植株，而其餘處理均固定於畦上且面朝南方。其餘試驗配置，均與前述試驗相同。

不同方位之效果評估試驗：黏紙顏色採用螢光黃色，黏紙固定於畦上，黏紙下緣與甘藷葉冠齊平 (中心點高於甘藷植株葉冠 7.5 cm)，具黏性面分別朝向東、南、西及北方，共 4 個方位，其餘試驗配置均與前述試驗相同。本試驗進行於 2018 年 2 月 23 日至3 月 2 日，試驗期間白晝時間為 693–702 min，太陽過中天的仰角 (正南方) 為 57–59°。

統計分析

蘿菜小金花蟲死亡率及黏紙捕獲蟲數之原始試驗數據，以 Levene's test 檢定變異數同質性，若各處理樣本變異數不同質，死亡率經反正弦函數轉換 [arcsine transformation; arcsin(X)]，蟲數則經開方根轉換 (square root transformation; $\sqrt{X}$)。試驗數據經變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理間差異顯著，則以最小顯著差異測驗法 (Fisher's least significant difference test; LSD test) 進行成對處理間比較。另以獨立樣本 t 檢定 (independent sample t-test)，比較相同藥劑於不同濃度下 (推薦濃度及 0.5× 濃度) 所造成死亡率之差異。上述檢定之顯著水準皆設定為 0.05。試驗數據以 R version 3.4.3 分析 (Levene's test 經由 car 執行，LSD test 經由 agricolae 套件執行)。

結果

室內藥效

九種藥劑於推薦濃度下對蘿菜小金花蟲造成之死亡率，如表 1 所示。不同藥劑效果間之差異達顯著水準 (Day 1: $F_{8,36} = 9.35$, $P < 0.001$; Day 2: $F_{8,36} = 21.16$, $P < 0.001$; Day 3: $F_{8,36} = 13.44$, $P < 0.001$)。9 種藥劑中，以 20% 亞滅培可濕性粉劑造成之死亡率最高，藥劑處理後第 2、3 日後死亡率分別達 90% 及 96%。20% 達特南水溶性粒劑、20% 芬化利乳劑及 43% 佈飛松乳劑等 3 種藥劑處理後，第 3 日可達 82% 以上之死亡率，與 20% 亞滅培可濕性粉劑間無顯著差異。50% 培丹水溶性粒劑、40% 納乃得水溶性粉劑及 34% 硫敵克水懸劑的藥效次之，小金花蟲於第 3 日死亡率介於 40–60%。而 5% 可芬諾水懸劑與 25% 二福隆可濕性粉劑處理後，死亡率低於 10%。

不同藥劑於減半推薦濃度下，藥效間存在顯著差異 (表 2) (Day 1: $F_{8,36} = 10.14$, $P < 0.001$; Day 2: $F_{8,36} = 13.02$, $P < 0.001$; Day 3: $F_{8,36} = 13.52$, $P < 0.001$)。其中，20% 亞滅培可濕性粉劑、20% 達特南水溶性粒劑、20% 芬化利乳劑及 43% 佈飛松乳劑，於第 3 日可造成 64–86% 死亡率，殺蟲效果顯著高於其他 5 種藥劑 (第 3 日死亡率 2–26%)。

各藥劑於推薦濃度及減半濃度之藥效差異上，以 20% 亞滅培可濕性粉劑及 34% 硫敵克水懸劑的殺蟲效果差異最為明顯，二者於推薦濃度下分別造成 96% 及 60% 死亡率 (第 3 日)，但於濃度減半後所造成之死亡率降低至 64% 及 22%；而其餘 7 種藥劑，在濃度減半後藥效差異不顯著 (圖 2)。

顏色、高度及張貼方位對黏紙誘引效果之影響

五種顏色黏紙所黏捕之蘿菜小金花蟲數量，如圖 3 所示。不同顏色黏紙對蘿菜小金花蟲的誘引效果間，具有顯著差異 ($F_{4,35} = 29.36$，$P < 0.001$)。平均黏捕蟲數，依序為螢光黃色 (21.8 隻)、黃色 (5.6 隻)、白色 (5.4

表 1. 九種殺蟲劑於推薦濃度下對蘿菜小金花蟲成蟲之殺蟲效果。

Table 1. Adulticidal effects of 9 insecticides with label rates against *Chaetocnema confinis*.

Chemical	Conc.[z] (%)	Mortality (mean ± SD, %) Day 1	Day 2	Day 3
Acetamiprid 20% WP[y]	0.010	68.0 ± 23.9 a[x]	90.0 ± 12.2 a	96.0 ± 8.9 a
Cartap 50% SG	0.050	46.0 ± 21.9 abc	38.0 ± 19.2 c	50.0 ± 24.5 c
Chromafenozide 5% SC	0.005	2.0 ± 4.5 D	2.0 ± 4.5 d	5.6 ± 8.2 d
Diflubenzuron 25% WP	0.017	2.0 ± 4.5 D	0.0 ± 0.0 d	2.0 ± 4.5 d
Dinotefuran 20% SG	0.007	54.0 ± 26.1 Ab	72.0 ± 25.9 ab	82.0 ± 24.9 ab
Fenvalerate 20% EC	0.007	64.7 ± 15.0 A	74.7 ± 10.4 a	82.2 ± 13.2 ab
Methomyl 40% SP	0.027	30.0 ± 12.2 C	32.0 ± 20.5 c	40.0 ± 30.8 c
Profenofos 43% EC	0.043	58.0 ± 21.7 A	78.0 ± 14.8 a	82.0 ± 14.8 ab
Thiodicarb 34% SC	0.034	34.0 ± 19.5 Bc	52.0 ± 19.2 bc	60.0 ± 21.2 bc
Distilled water (control)	-	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 4.5

[z] The concentration of active ingredient of the insecticides.

[y] WP: wettable powders; SG: water soluble granules; SC: suspension concentrates; EC: emulsifiable concentrates; and SP: water soluble powder.

[x] Values within a column followed by the same letter are not significantly different by the lease significant difference (LSD) test at 5% level.

表 2. 九種殺蟲劑於減半推薦濃度下對蘿菜小金花蟲成蟲之殺蟲效果。

Table 2. Adulticidal effects of 9 insecticides with half label rates against *Chaetocnema confinis*.

Chemical	Conc.[z] (%)	Mortality (mean ± SD, %) Day 1	Day 2	Day 3
Acetamiprid 20% WP [y]	0.005	56.0 ± 18.2 a[x]	56.0 ± 25.1 a	64.0 ± 23.0 a
Cartap 50% SG	0.025	14.0 ± 19.5 c	22.0 ± 16.4 b	24.0 ± 13.4 b
Chromafenozide 5% SC	0.003	0.0 ± 0.0 c	2.0 ± 4.5 bc	2.0 ± 4.5 b
Diflubenzuron 25% WP	0.008	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 c	6.0 ± 13.4 b
Dinotefuran 20% SG	0.003	42.0 ± 19.2 a	58.0 ± 19.2 a	64.0 ± 24.1 a
Fenvalerate 20% EC	0.003	56.0 ± 20.7 a	60.0 ± 21.2 a	76.0 ± 15.2 a
Methomyl 40% SP	0.013	20.0 ± 18.7 bc	22.0 ± 16.4 b	26.0 ± 18.2 b
Profenofos 43% EC	0.022	38.0 ± 17.9 ab	70.0 ± 15.8 a	86.0 ± 19.5 a
Thiodicarb 34% SC	0.017	8.0 ± 8.4 c	20.0 ± 14.1 bc	22.0 ± 29.5 b
Distilled water (control)	-	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 4.5

[z] The concentration of active ingredient of the insecticides.

[y] WP: wettable powders; SG: water soluble granules; SC: suspension concentrates; EC: emulsifiable concentrates; and SP: water soluble powder.

[x] Values within a column followed by the same letter are not significantly different by the least significant difference (LSD) test at 5% level.

隻)、綠色 (4.9 隻) 及藍色 (1.4 隻)，其中以螢光黃色黏紙上的蘿菜小金花蟲數顯著多於其餘 4 者，黃色、白色及綠色等 3 種黏紙間無顯著差異，藍色黏紙黏捕蟲數最少，與其他顏色者呈顯著差異。

不同懸掛高度之黏紙所黏捕之蘿菜小金花蟲數量，如圖 4 所示。懸掛高度對於此蟲誘捕數量間，具顯著影響 ($F_{3,28}$ = 21.84，P < 0.001)，捕獲蟲數隨懸掛高度增加而遞減。4 個高度中，以黏紙低於甘藷植冠 7.5 cm 的誘捕蟲數最多 (12.9隻)，而後依序為高於植冠 7.5 cm (6.6 隻)、17.5 cm (3.3 隻) 及 27.5 cm (1.3

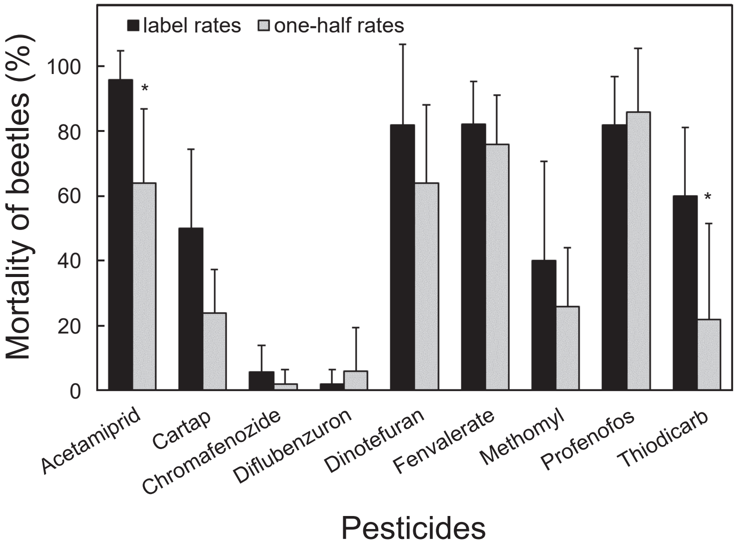

圖 2. 九種殺蟲劑在推薦濃度及減半濃度下於第 3 日造成蕹菜小金花蟲成蟲死亡率之比較。

Fig. 2. Comparison between the mortality of 9 insecticides with label rates (black bars) and one-half rates (grey bars) against *Chaetocnema confinis* on the third day. Each bar represents means and standard deviations (SDs) of 5 replicates. Bars in the same treatment (pesticide) with the asterisk are significantly different by independent sample *t*-test at 5% level.

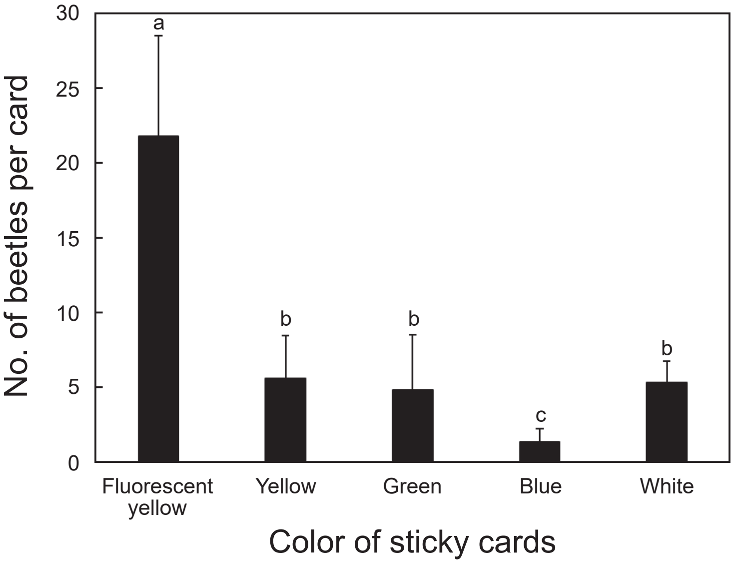

圖 3. 不同顏色黏紙誘捕之蕹菜小金花蟲成蟲數量。

Fig. 3. Number of adults of *Chaetocnema confinis* captured per sticky card of different colors. Each bar represents means and standard deviations (SDs) of 8 replicates. Bars with the same letter are not different significantly by the least significant difference (LSD) test at 5% level.

隻)，且 4 者誘捕蟲數間皆呈顯著差異。

黏紙面朝不同方位所捕捉之蕹菜小金花蟲數量，如圖 5 所示。黏紙面朝東、南、西及北方的平均捕捉蟲數，分別為 37.9、38.8、28.4

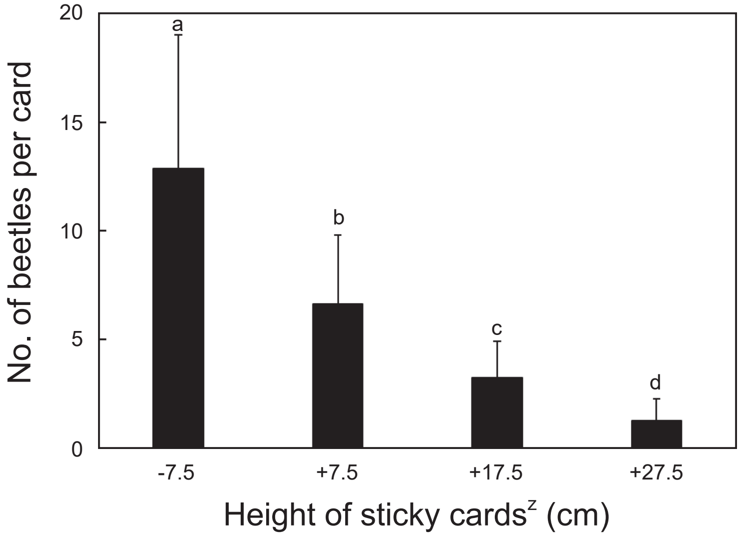

圖 4. 不同擺放高度之黏紙誘捕之蕹菜小金花蟲成蟲數量。

Fig. 4. Number of adults of *Chaetocnema confinis* captured per sticky card with different installation heights. Each bar represents mean and standard deviation (SD) of 8 replicates. Bars with the same letter are not different significantly by the least significant difference (LSD) test at 5% level.

^{z} The height between the sweet potatoes canopy and the center of sticky cards. The plus sign and the minus sign indicate that the sticky cards were above or below the canopy, respectively.

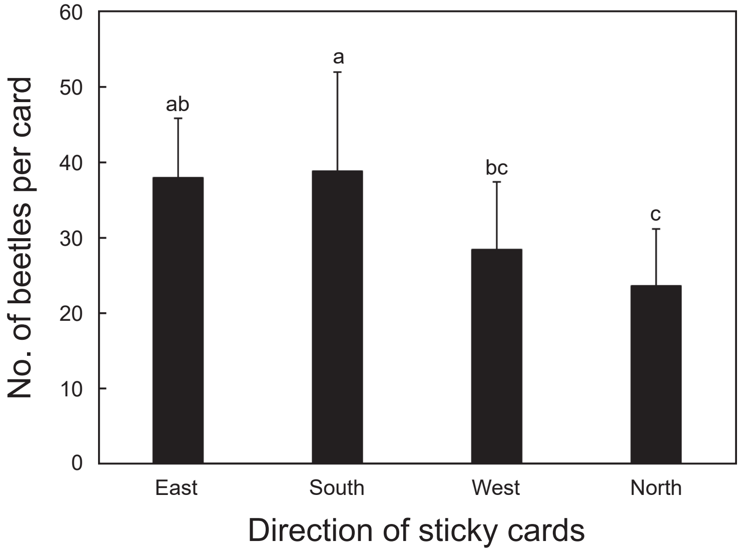

圖 5. 不同擺放方位之黏紙誘捕之蕹菜小金花蟲成蟲數量。

Fig. 5. Number of adults of *Chaetocnema confinis* captured per sticky card with different directions. Each bar represents mean and standard deviation (SD) of 8 replicates. Bars with the same letter are not different significantly by the least significant difference (LSD) test at 5% level.

及 23.6 隻，4 個方位所捕捉蟲數間存在顯著差異 ($F_{3,28}$ = 4.624，P < 0.01)。其中，黏紙面朝南方的蟲數最多，與朝東者並無顯著差異，但顯著多於朝西方及北方者。

討論

本試驗透過葉片藥膜處理方式，檢測已登記與延伸使用殺蟲劑對蕹菜小金花蟲成蟲的室內殺蟲效果。9 種藥劑中，以 20% 亞滅培可濕性粉劑、20% 達特南水溶性粒劑、20% 芬化利乳劑及 43% 佈飛松乳劑的藥效較佳，於第 3 日之死亡率可達 82–96%。而當藥劑濃度減半，唯 43% 佈飛松乳劑仍保有較高的殺蟲效果 (第 3 日死亡率為 86%)，多數藥劑的殺蟲效果皆有降低趨勢，但僅 20% 亞滅培可濕性粉劑及 34% 硫敵克水懸劑達顯著差異。Hayashikawa & Fukuda (2016) 以類似方式評估 19 種藥劑之室內藥效，共 10 種藥劑可造成 84–100% 的小金花蟲成蟲死亡 (不含抽搐蟲體)，包含 3 種胺基甲酸鹽類或有機磷類藥劑 (75% 硫敵克可濕性粉劑、50% 撲滅松乳劑及 45% 普硫松乳劑)、2 種除蟲菊酯類藥劑 (20% 百滅寧乳劑及 20% 依芬寧乳劑)、3 種新尼古丁類藥劑 (50% 益達胺水分散性粒劑、16% 可尼丁水溶性粒劑及 20% 達特南水分散性粒劑)、10% 克凡派水懸劑及 1 種混合劑 (40% 芬化利-馬拉松可濕性粉劑)；另 45% 納乃得可濕性粉劑可造成 54% 死亡率 (26% 無法正常行走)。其中，硫敵克、達特南及納乃得為 Hayashikawa & Fukuda (2016) 與本試驗皆有檢測之藥劑種類，因其檢測劑量為本試驗約 1.3–2.9 倍，此可能係造成殺蟲效果略高於本試驗結果之原因。此外，本研究比較 9 種殺蟲劑於原推薦藥量與減半藥量之藥效，於藥效較佳之 4 種藥劑 (20% 亞滅培可濕性粉劑、20% 達特南水溶性粒劑、20% 芬化利乳劑及 43% 佈飛松乳劑)，20% 亞滅培可濕性粉劑於劑量減半後所造成蕹菜小金花蟲死亡率顯著較低，另 3 種藥劑則無顯著差異。由此可知，田間藥劑施用上，不應擅自減低劑量以免藥效不彰。另藥效減半後仍有相似殺蟲效果者，則值得後續田間藥效評估，或可作為農藥減量施用之基礎。

本試驗以培丹處理的小金花蟲後，部分痙攣、抽搐者有短暫恢復正常的現象，此類似狀況亦曾出現於甘藷蟻象成蟲之藥劑試驗中 (Chen *et al*. 2017)。而於 Hayashikawa & Fukuda (2016) 之試驗中，接觸納乃得或硫敵克的成蟲，於 2 d 後其未死亡但無法正常行走之比例較高。由上述推測，蕹菜小金花蟲對於胺基甲酸鹽類藥劑的代謝能力或許較佳，藥劑選用上應需加以考量。另一方面，5% 可芬諾水懸劑及 25% 二福隆可濕性粉劑，為檢測藥劑中殺成蟲效果不顯著者，兩者於第 3 日造成之蕹菜小金花蟲成蟲死亡率分別為 5.6% 及 2.0%。兩者皆為昆蟲生長調劑劑，其中，可芬諾屬於二醯基聯氨類 (diacylhydrazines)，為非固醇類蛻皮激素促效劑 (non-steroidal molting hormone agonists)，對於鱗翅目昆蟲具毒效，而對於雙翅目、鞘翅目昆蟲則效果較差或無效 (Nakagawa *et al*. 2005)。二福隆係昆蟲幾丁質合成抑制劑 (chitin synthesis inhibitors)，可影響鞘翅目昆蟲之生長發育，以四紋豆象 (*Callosobruchus maculatus* Fab.) 為例，二福隆具殺卵效果，亦會抑制雌蟲產卵量，但對於蛹及成蟲則不具顯著殺蟲效果 (Kemabonta & Odebiyi 2005)；於 *Pachnaeus litus* (Germar)、*Diaprepes abbreviates* (L.) 等 4 種象鼻蟲上，亦會顯著降低卵孵化率 (Lovestrand & Beavers 1980)。但由於蕹菜小金花蟲幼蟲生活於土壤中，而成蟲則危害葉片，葉面施藥上以針對成蟲為主，按本試驗結果顯示兩藥劑對於成蟲無顯著急性毒，然而是否可抑制成蟲產卵量與卵孵化率，乃值得後續探究。

目前雖未有研究揭示蕹菜小金花蟲對顏色之偏好性，然而同屬的 *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer 對黃色最具偏好 (Adams & Los 1986)，亦有前人利用黃色黏紙調查蕹菜小金花蟲田間密度 (Jolivet 2008; Hayashikawa *et al*. 2014)。據本研究結果，以螢光黃色相對其他顏色對蕹菜小金花蟲成蟲最具吸引力，誘引蟲數約為其他顏色 4 倍以上。然而，昆蟲多具有基礎之紫外光-藍光-綠光三色視覺 (UV-blue-green-trichromacy)，其感光受器 (photoreceptor) 有別於人類，故兩者可見光譜並不相同 (Briscoe & Chittka 2001)。因此，本研究進一步分析各色黏紙於反射光譜的差異，以更精確得知蕹菜小金花蟲於光趨性之偏好。比較 5 種有色黏紙反射光譜率曲線 (圖 1)，螢光黃色黏紙於波長 530 nm 左右具 1 個相對反射率曲

線高峰 (相對反射率約 90%)，其餘 4 色黏紙於此波段的光線相對反射率皆未達 60%，又以藍色黏紙相對反射率最低。另白色黏紙於反射波長 435 nm 及 480 nm 各具 1 個峰值 (相對反射率分別約為 85% 及 70%)，藍色黏紙亦於 480 nm 具 1 個反射高峰 (相對反射率約 50%)，反之，螢光黃色黏紙於該 2 波段的相對反射率均甚低 (約 15%)。據 Yang *et al*. (2003) 於黃條葉蚤 [*Phyllotreta striolata* (Fabricius)] 之研究，成蟲對於光波長為 350 nm、430 nm 及 490–520 nm 之光趨性行為最為顯著，其中以波長 430 nm 的藍光吸引力最高。而科羅拉多金花蟲 [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] 具有分辨紫外光、藍光及綠光之 3 種感光受器，分別對於波長落在 370、450 及 530 nm 左右的光線較敏感 (Döring & Skorupski 2007)。推測同屬金花蟲科之蘿菜小金花蟲，亦具有感測相似波段之感光受器，且波長 530 nm 左右的光線對於蘿菜小金花蟲應較具吸引力，光趨性行為則隨著光反射率愈高而提升。但由於昆蟲色覺神經機制相當複雜，不同強度、波長之光線間拮抗或加成等交互作用下，可能導致不同生理反應 (Hempel de Ibarra *et al*. 2014)，其他波段光線對於誘引效果是否具有影響 (如白色黏紙反射光譜涵蓋紫外光段及藍光段)，尚需深入研究。

除了顏色之外，黏紙擺放高度亦為影響誘捕量之重要因素 (Mainali & Lim 2010; Cottrell 2017; Yadav *et al*. 2017)。一般而言，黏紙於田間之設置高度多為與作物同高或稍高，以配合作物生長或避免被枝葉遮蔽 (Lin 2010)，例如於 Jasrotia *et al*. (2008) 的試驗中，調查蘿菜小金花蟲密度的黏紙擺放高度為高於葉冠 5 cm。然而本研究結果顯示，當黏紙高度稍低於植冠時，誘殺蟲數反而最多，且誘殺蟲數隨黏板設置高度增加而遞減。造成此差異之原因，可能為當黏紙位於蘿菜小金花蟲視覺易察覺及易前往之位置時，誘捕效力較強，因此推測誘捕效果與此蟲活動範圍及視覺能力有關。此外，蘿菜小金花蟲屬於葉蚤亞科 (Alticinae)，該亞科昆蟲跳躍能力佳，有些可跳躍達身長 100 倍之距離 (Furth 1988)。然而目前尚無研究顯示蘿菜小金花蟲之跳躍、飛翔能力，亦不清楚其視力可察覺之範圍，因此黏紙高度對誘捕量影響之原因尚需深入研究。然而，即使僅 20 cm 之差距，黏紙高於植冠 7.5 cm 的平均誘殺蟲數，卻為高於植冠 27.5 cm 者之 5 倍，故而若採黏紙監測或防治蘿菜小金花蟲，其設置高度應盡量貼近植株，避免超過植冠約 7.5 cm。

在黏紙朝向不同方位的誘引試驗中，面朝南方及東方的誘引效果較佳，誘捕蟲數約為朝北面者之 1.6 倍。方位對黏紙誘捕數量之影響，可能來自於風向及陽光照射角度等因素。其中，因蘿菜小金花蟲不若粉蝨、薊馬等小型害蟲體重較輕而易隨氣流傳播，因此風向的影響性可能較小。由於昆蟲受晝夜節律影響，不同時段下之光趨行為強度或有不同 (Yang *et al*. 2003; Liu *et al*. 2009)，而有色黏紙之誘捕仰賴黏紙反射陽光。台灣位處北半球，黏紙面朝東、南及西邊所接受陽光直射之時間較北方長，可能因而影響黏紙誘引效果。Bian *et al*. (2016) 於中國大陸江西省、貴州省之茶園測試東-西向及南-北向之黏紙對薊馬之誘捕效果，發現東-西向之黏紙黏捕蟲數較多，其亦推測原因為東-西向接受較多陽光照射。此外，田區周遭環境，亦可能影響不同方位黏紙之誘捕效果。由於本試驗於單一田區進行試驗，黏紙面朝方位於其他地區是否亦呈現相同影響，則應進一步檢測及探討。另一方面，雖然於田間利用黏紙防治害蟲時多半不考慮設置之方位，因為黏紙可能為雙面或卷成直筒狀，但若利用單面有色黏紙時，則不可忽視方向於黏捕效果之影響。

由於現行安全性植物保護資材對金花蟲類害蟲防治效果有限 (unpublished data)，使用化學防治亦具農藥殘留、環境汙染及昆蟲抗藥性產生之風險，利用昆蟲對顏色之偏好行為反應進行物理防治，似乎為可行之選擇。而改善黏紙誘殺之效率，或許可提升物理防治之應用性。由本研究之結果建議田間應用時，採用螢光黃色黏紙 (或類似反射光譜者)，擺放位置貼近植株，可提升對蘿菜小金花蟲的誘捕數量。除了顏色、高度及方位之外，黏紙的形狀、面

積、擺放角度及背景色等，亦為影響誘引效果的重要因子 (Mainali & Lim 2010; Cottrell 2017; Yadav *et al*. 2017)。因此，未來評估其他因子對誘捕效果之影響，找尋效果最佳之黏紙樣式及設置方法，或進一步地評估與化學藥劑兼用下的防治效益，將有助於提升田間之實務應用價值。

誌謝

本文承蒙國立台灣大學昆蟲學系楊恩誠教授於光譜反射分析之協助與寶貴建議，及本分所研究室同仁林郁欣小姐與黃瓊慧小姐辛勞協助試驗工作，謹此致謝。

引用文獻

Abney, M. R. and G. G. Kennedy. 2011. Relative susceptibility of two sweetpotato varieties to storage root damage by sweetpotato flea beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) and wireworm (Coleoptera: Elateridae). J. Econ. Entomol. 104:143–148.

Adams, R. G. and L. M. Los. 1986. Monitoring adult corn flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in sweet corn fields with color sticky traps. Environ. Entomol. 15:867–873.

Al-Ayedh, H. and M. Al-Doghairi. 2004. Trapping efficiency of various colored traps for insects in cucumber crop under greenhouse conditions in Riyadh, Saudi Arabia. Pak. J. Biol. Sci. 7:1213–1216.

Bian, L., P. X. Yang, Y. J. Yao, Z. X. Luo, X. M. Cai, and Z. M. Chen. 2016. Effect of trap color, height, and orientation on the capture of yellow and stick tea thrips (Thysanoptera: Thripidae) and nontarget insects in tea gardens. J. Econ. Entomol. 109:1241–1248.

Briscoe, A. D. and L. Chittka. 2001. The evolution of color vision in insects. Annu. Rev. Entomol. 46:471–510.

Broughton, S. and J. Harrison. 2012. Evaluation of monitoring methods for thrips and the effect of trap colour and semiochemicals on sticky trap capture of thrips (Thysanoptera) and beneficial insects (Syrphidae, Hemerobiidae) in deciduous fruit trees in Western Australia. Crop Prot. 42:156–163.

Chalfant, R. B., R. K. Jansson, D. R. Seal, and J. M. Schalk. 1990. Ecology and management of sweet potato insects. Annu. Rev. Entomol. 35:157–180.

Chen, P. H., T. C. Wang, C. H. Huang, Y. F. Chu, and S. H. Huang. 2017. Evaluation of insecticides recommended for controlling the adult of sweetpotato weevil [*Cylas formicarius* (Fabricius)] (Coleoptera: Brentidae) in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 66:34–43. (in Chinese with English abstract)

Cottrell, T. E. 2017. Trap height affects capture of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) in pecan orchards. Environ. Entomol. 46:343–352.

Döring, T. F. and P. Skorupski. 2007. Host and non-host leaves in the colour space of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Entomol. Gen. 29:81–95.

Durmuşoğlu, E., M. Salaman, H. S. Civelek, A. Hatipoglu, and H. Balci. 2009. Effect of various hues of yellow as sticky trap color on leafminers in cucumber growing greenhouses. Türk. Entomol. Derg. 33:163–170.

Feng, H. T., Y. J. Huang, and J. C. Hsu. 2000. Insecticide susceptibility of cabbage flea beetle [*Phyllotreta striolata* (Fab.)] in Taiwan. Plant Prot. Bull. 42:67–72. (in Chinese with English abstract)

Furth, D. G. 1988. The jumping apparatus of flea beetles (Alticinae)-the metafemoral spring. p.285–297. *in*: Biology of Chrysomelidae (Jolivet, P., E. Petitpierre, and T. H. Hsiao, eds.) Kluwer Academic. Dordrecht, The Netherlands. 615 pp.

Hayashikawa, S., K. Takesaki, T. Fukuda, S. Mizushima, and S. Yamashita. 2013. Biology and management of the sweetpotato flea beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch). 1. sweetpotato tuberous root damege caused by sweetpotato flea beetle larvae. Kyushu Plant Prot. Res. 59:72–76. (in Japanese with English abstract)

Hayashikawa, S., T. Fukuda, and S. Yamashita. 2014. Biology and management of the sweetpotato flea beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch). 2. seasonal timing of *C. corfines* larvae make damage on tuberous root of field sweetpotato in Tanegashima Island, Kagoshima. Kyushu Plant Prot. Res. 60:64–67. (in Japanese with English abstract)

Hayashikawa, S., T. Fukuda, and S. Yamashita. 2015. Biology and management of the sweetpotato flea beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch). 3. effects of sweetpotato field cultivational conditions in Tanegashima Island, Kagoshima on *C. corfines* larvae damage to tuberous root. Kyushu Plant Prot. Res. 61:43–48. (in Japanese with English abstract)

Hayashikawa, S. and T. Fukuda. 2016. Biology and management of the sweet potato flea beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch). 4. effect of several insecticides against *C. confinis* adults and a preliminary test on suppression of tuber damage by application of granular insecticides to a sweet potato field. Kyushu Plant Prot. Res. 62:95–99. (in Japanese with English abstract)

Hempel de Ibarra, N., M. Vorobyev, and R. Menzel. 2014. Mechanisms, functions and ecology of colour vision in the honeybee. J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol. 200:411–433.

Jasrotia, P., M. R. Abney, N. B. Neerdaels, and G. G. Kennedy. 2008. Influence of soil temperature, rainfall, and planting and harvest dates on *Chaetocnema confinis* (Coleoptera: Chrysomelidae) damage to sweetpotato roots. J. Econ. Entomol. 101:1238–1243.

Jolivet, P. 2008. Sweetpotato flea beetle, *Chaetocnema confinis* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). p.3640–3642. *in*: Encyclopedia of Entomology. (J. L. Capinera, ed.) Springer Publishing. Dordrecht, The Netherlands. 4346 pp.

Kemabonta, K. A. and J. A. Odebiyi. 2005. Susceptibility of the life stages of Callosobruchus maculatus Fab. (Coleoptera: Bruchidae) to diflubenzuron in cowpea seeds. J. Plant Dis. Protect. 112:193–199.

Li, L., H. B. Ma, L. M. Niu, D. Y. Han, F. P. Zhang, J. Y. Chen, and Y. G. Fu. 2017. Evaluation of chromatic cues for trapping *Bactrocera tau*. Pest. Manag. Sci. 73:217–222.

Lin, F. C. 2010. Color trapping. p.109–114. *in*: Nonsynthetic Resources for Pest Management. (Wang, C. L., ed.) Taiwan Agric. Res. Inst. Spec. Pub. No. 142. Taichung, Taiwan. 183 pp. (in Chinese)

Liu, W. Y., E. C. Yang, and S. J. Lee. 2009. The action spectrum of phototactic responses of *Forcipomyia* (Lasiohelea) *taiwana* (Shiraki) (Diptera: Ceratopogonidae). Formosan Entomol. 29:61–71.

Lovestrand, S. A. and J. B. Beavers. 1980. Effect of diflubenzuron on four species of weevils attacking citrus in Florida. Fla. Entomol. 63:112–115.

Mainali, B. P. and U. T. Lim. 2010. Circular yellow sticky trap with black background enhances attraction of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). Appl. Entomol. Zool. 45:207–213.

Nakagawa, Y., K. Takahashi, H. Kishikawa, T. Ogura, C. Minakuchi, and H. Miyagawa. 2005. Classical and three-dimensional QSAR for the inhibition of [^{3}H] ponasterone A binding by diacylhydrazine-type ecdysone agonists to insect Sf-9 cells. Bioorg. Med. Chem. 13:1333–1340.

Poland, T. M. and D. G. Mccullough. 2014. Comparison of trap types and colors for capturing emerald ash borer adults at different population densities. Environ. Entomol. 43:157–170.

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute. 2018. Plant protection information system. TACTRI, COA, Taichung, Taiwan. https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm/ (visit on 10/8/2018)

Thein, M. M., T. Jamjanya, and Y. Hanboonsong. 2011. Evaluation of colour traps to monitor insect vectors of sugarcane white leaf phytoplasma. Bull. Insectology 64:117–118.

Toshove, T. B., D. I. Velchev, V. D. Abaev, P. K. Kalushkov, E. Orgovan, Z. Lohonyai, M. Tóth, and S. Koczor. 2017. Nontarget coleoptera species captured in coloured sticky traps in maize crops in Bulgaria. Acta Zool. Bulg. Suppl. 9:237–246.

Yadav, D. S., A. Udayakumar, R. S. Jadhav, A. R. Jadhav, A. M. Bhosale, and R. G. Somkuwar. 2017. Effect of trap colour, installation height and size on insect capture in grapevine (*Vitis vinifera*) ecosystem. Indian J. Agric. Sci. 87:804–810.

Yang, E. C., D. W. Lee, and W. Y. Wu. 2003. Action spectra of phototactic responses of the flea beetle, *Phyllotreta striolata*. Physiol. Entomol. 28:362–368.

A Preliminary Study on Control Efficacy of Chemical Insecticides and Colored Sticky Cards against the Sweet Potato Flea Beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch)

Yu-Ping Liang[1] and Po-Hung Chen[1,*]

Abstract

Liang, Y. P. and P. H. Chen. 2019. A preliminary study on control efficacy of chemical insecticides and colored sticky cards against the sweet potato flea beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch). J. Taiwan Agric. Res. 68(1):78–89.

The sweet potato flea beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch) is a common pest of sweet potato. The larvae and adults feed on storage roots and leaves, respectively, reducing the quality of both parts. Because of the lack of research on its control techniques, this study focused on *C. confinis* adults, evaluating the efficacy of currently recommended pesticides and sticky traps of various colors, heights, and orientations. The efficacy of 9 pesticides against *C. confinis* was assessed by the leaf disc method, and the results showed that acetamiprid (20% wettable powders; WP), dinotefuran (20% water soluble granules; SG), fenvalerate (20% emulsifiable concentrates; EC) and profenofos (43% EC) caused the greatest mortality, which reached 96, 82, 82 and 82% on the third day, respectively. In the sticky trap experiments, fluorescent yellow colored traps attracted the most *C. confinis* (21.8 beetles trap^{-1}) among 5 colors (fluorescent yellow, yellow, green, blue and white), while blue was the least attractive (1.4 beetles trap^{-1}). According to the spectral reflectance curves of the colored sticky cards, the green light with wavelengths around 530 nm might be more attractive to *C. confinis*. Besides, the traps hung lower than the sweet potato leaf canopy captured the most *C. confinis*, and the number captured decreased as the height increased. Lastly, trapping effectiveness was also affected by trap orientation. The sticky cards oriented to south captured the most *C. confinis* (38.8 beetles trap^{-1}), while those facing the north captured the least in this single experiment.

Key words: Sweet potato flea beetle, Insecticide, Colored sticky cards.

Received: June 11, 2018; Accepted: November 3, 2018.
* Corresponding author, e-mail: chenph@dns.caes.gov.tw
1 Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University
Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University
Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University
Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University
Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University
Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station
Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University
Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editor

Chu, Yan-Hwa
Product and Process Research Center, Food Industry Research and Development Institute

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultant to Editorial Office

Chan, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute
Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 68 No. 1 March 31, 2019

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330